



Nº de ordem: _____

Ano de _____

TESE DE DOUTORAMENTO

apresentada na
UNIVERSIDADE DA MADEIRA

Para obtenção do grau de Doutor

Irene Gomes Câmara Camacho

ESTUDO AEROBIOLÓGICO DA CIDADE DO FUNCHAL.
DETECÇÃO BIOQUÍMICA DOS PRINCIPAIS AEROALERGÉNIOS POLÍNICOS.

Defendida em _____ do mês de _____

Júri:

Professor Doutor Pedro Telhado Pereira (Reitor da Universidade da Madeira)

Professora Doutora Ilda Conceição Abreu de Noronha (Universidade do Porto)

Professor Doutor Eugenio Domínguez Vilches (Universidade de Córdoba, Espanha)

Professor Doutor Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho (Universidade da Madeira)

Professor Doutor Rui Manuel Almeida Brandão (Universidade de Évora)

Professora Doutora Manhaz Khadem (Universidade da Madeira)

Professor Doutor Miguel Pinto da Silva Menezes de Sequeira (Universidade da Madeira)

Professora Doutora Maria Isabel Carvalho de Melo Vieira Torres (Universidade da Madeira)

Observar para Compreender

Compreendendo a Duvidar

Interagir e Reaprender

Gostar para Motivar

Aplicar e Inovar.

"Em cada semente encontra-se a promessa de milhares de florestas."

Deepak Chopra

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	VII
ABREVIATURAS	VIII
NOTA INTRODUTÓRIA	9
RESUMO	10
OBJECTIVOS	14
CAPÍTULO I - ESTUDO AEROBIOLÓGICO DA CIDADE DO FUNCHAL	15
INTRODUÇÃO	16
1. Breve Análise Epidemiológica da Doença Alérgica	17
1.1. Incidência da Doença Alérgica. Panorama Internacional.....	17
1.2. Panorama Nacional	18
1.3. Epidemiologia da Alergia na Região Autónoma da Madeira (R.A.M.).....	18
2. Monitorização Aerobiológica na Europa	20
2.1. Estudos Aerobiológicos em Portugal	20
3. Pólen e Fungos como Bioaerossóis	21
3.1. Bioaerossóis.....	21
3.2. Biologia do Grão de Pólen	22
3.2.1. Bioquímica do Grão de pólen	23
3.2.2. Ultraestrutura <i>versus</i> Estrutura	23
3.2.3. Dimensão <i>versus</i> Polinização.....	23
3.2.4. Factores de Distribuição.....	23
3.3. Os Esporos de Fungos	24
3.3.1. Habitat	24
3.3.2. Distribuição.....	24
3.3.3. Importância	25
3.3.4. Estrutura e Formas de Reprodução	25
3.3.4.1. Fases do Ciclo de Vida	27
3.3.5. Forma de Dispersão	29
3.3.6. Capacidade Alergizante	29
3.4. Tecnologias de Monitorização de Bioaerossóis.....	29
3.5. Técnicas de Captação de Pólen e Esporos.....	30
3.5.1. A Identificação dos Esporos de Fungos	30
3.6. Monitorização de Aerossóis a Larga Escala	30
3.7. Fenologia Vegetal <i>versus</i> Clima	32
3.8. Modelos de Previsão.....	33
MATERIAIS E MÉTODOS	34
1. Situação Geográfica e Características Geo-climáticas do Arquipélago da Madeira	34
2. Descrição da Área de Estudo	34
3. Período de Estudo.....	36
4. Meteorologia Observada	36
5. Método de Captação	41
6. Tratamento das Amostras.....	41
7. Análise Qualitativa	41
8. Análise Quantitativa.....	42
8.1. Conversão dos Resultados para Concentrações Horárias e Diárias.....	42
9. Classificação Taxonómica dos Pólenes e Esporos de Fungos	42
10. Análise dos Resultados	43
RESULTADOS	47
1. Análise Polínica Global.....	47
Asteraceae	60
Boraginaceae.....	63

Chenopodiaceae-Amaranthaceae.....	65
Corylaceae	67
Cupressaceae	69
Ericaceae	71
Euphorbiaceae.....	73
Fabaceae	75
Ginkgoaceae.....	79
Myrtaceae	81
Myricaceae	83
Nyctaginaceae	85
Pinaceae	87
Plantaginaceae	89
Platanaceae.....	91
Poaceae	93
Polygonaceae	95
Solanaceae.....	97
Urticaceae.....	99
2. Análise Aeromicológica Global	102
Agaricus (L. 1753)	117
Alternaria (Nees. 1816)	119
Arthrinium (Kunze 1817)	121
Botrytis (P. Micheli ex Pers. 1794).....	123
Cladosporium (Link 1816).....	125
Coprinus (Pers. 1797).....	127
Curvularia (Boedijn 1933)	129
Drechslera (S. Ito. 1930)	131
Epicoccum (Link 1815)	133
Fusarium (Link 1809)	135
Ganoderma (P. Karst. 1881).....	137
Gliomastix (Guég. 1905)	139
Leptosphaeria (Ces. & De Not. 1863).....	141
Lophiostoma (Ces & De Not. 1863)	143
Nigrospora (Zimm. 1902).....	145
Periconia (Tode 1791).....	147
Pleospora (Rabenh. Ex Ces & De Not 1863)	149
Polythrincium (Kunze 1817)	151
Puccinia (Pers. 1801).....	153
Sordaria (Ces. & De Not. 1863)	155
Spegazzinia (Sacc. 1879).....	157
Stemphylium (Wallr. 1833)	159
Tetraploa (Berk. & Broome 1850).....	161
Torula (Pers. 1794)	163
Venturia (De Not. 1844)	165
Xylaria (Hill ex Schrank 1789)	167
Esporos de Fetos.....	169
DISCUSSÃO	173
1. Análise dos Tipos Polínicos	173
Asteraceae	173
Boraginaceae.....	173
Chenopodiaceae-Amaranthaceae.....	174
Cupressaceae	175
Ericaceae	175
Euphorbiaceae.....	175
Fabaceae	176
Ginkgoaceae.....	176
Myrtaceae	176
Myricaceae	177
Pinaceae	177
Plantaginaceae	177
Platanaceae.....	178
Poaceae	178
Urticaceae.....	180

1.1. Composição Aerobiológica do Funchal.....	181
1.2. Fenologia de Tipos Polínicos	182
1.3. Factores Condicionantes da Variabilidade Aerobiológica	182
2. Análise dos Tipos de Esporos.....	184
Agaricus.....	184
Alternaria.....	184
Arthrinium.....	185
Botrytis.....	185
Coprinus	186
Curvularia	187
Fusarium.....	188
Leptosphaeria.....	189
Lophiostoma.....	189
Pleospora	190
Polythrincium	190
Puccinia	191
Sordaria.....	191
Tetraploa	192
Torula.....	192
Venturia.....	192
Xylaria	193
Esporos de Fetos.....	193
2.1. Total Anual de Fungos	194
2.2. Ocorrência das Classes Predominantes	194
2.3. O Esporo de Fungo Predominante	194
2.4. Meteorologia <i>versus</i> Concentração de Esporos de Fungos	194
2.4.1. Variação Diária da Concentração de Esporos de Fungos	195
2.4.2. Efeito das Variáveis Meteorológicas.....	195
2.5. Variáveis Meteorológicas e Mecanismos de Dispersão dos Esporos de Fungos	196
2.6. Vegetação Circundante.....	196
2.7. A Correlação entre Esporos de Fungos e Pólenes.....	197
2.8. A proporção de Esporos de Fungos e Pólenes	197
CONCLUSÃO	198
PERSPECTIVAS FUTURAS	199
1. Monitorização Aerobiológica Local	199
2. Ambiente “ <i>outdoor</i> ” e “ <i>indoor</i> ”	199
3. Aerobiologia Predictiva	200
4. Monitorização a Larga Escala Espaço-Temporal.....	200
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	202
CAPÍTULO II - DETECÇÃO BIOQUÍMICA DOS PRINCIPAIS AEROALERGÉNIOS POLÍNICOS DA CIDADE DO FUNCHAL.....	214
INTRODUÇÃO.....	215
1. Aeroalergénios. Definição e Propriedades.....	215
1.1. Síntese e Localização Ultraestrutural dos Alergénios.....	215
1.2. Nomenclatura e Classificação	216
1.3. Transporte dos Alergénios do Pólen.....	216
1.4. Função Biológica dos Alergénios	217
1.5. O Reconhecimento Antigénio-IgE	217
1.5.1. IgE e Doença Alérgica	218
1.6. Factores de Desenvolvimento dos Processos Alérgicos.....	219
1.6.1. Factores Ambientais.....	219
1.6.2. Factores Genéticos.....	220
1.7. Aeroalergénios Importantes	220
2. Caracterização de Alergénios.....	221
2.1. Etapas da Caracterização de Alergénios	221
2.2. Dificuldades na Análise de Alergénios	222

2.3. Técnica Electroforética para a Caracterização Bioquímica de Alergénios	222
2.4. <i>Imunoblotting</i>	222
MATERIAIS E MÉTODOS	224
1. Material Vegetal	224
2. Tratamento do Material	224
3. Soros	225
4. Extracção das Proteínas do Pólen.....	225
4.1. Diálise	225
5. Quantificação de Proteína	226
6. Caracterização Molecular	226
7. Preparação de Extractos	226
8. SDS-PAGE	226
9. Revelação das Proteínas	227
10. Determinação da Massa Molecular em SDS-PAGE.....	227
11. <i>Imunoblotting</i> . Transferência das Proteínas para a Membrana de Nitrocelulose	227
12. Detecção da Reacção Antígeno-Anticorpo	228
13. Revelação das Proteínas Transferidas para a Membrana.....	229
RESULTADOS	230
DISCUSSÃO	236
1. O Procedimento de Extracção Proteica	236
1.1. A Eluição Proteica.....	236
2. Optimização de Etapas da Caracterização Molecular	237
3. Polimorfismo Proteico	238
4. Análise de <i>Imunoblotting</i> referente às distintas fontes alergénicas	238
4.1. Asteraceae.....	238
4.2. <i>R. communis</i> (Euphorbiaceae)	239
4.3. <i>A. mearnsii</i> (Fabaceae).....	240
4.4. <i>P. pinaster</i> (Pinaceae)	240
4.4.1. (Aero)biologia e alergenidade.....	240
4.4.1. Actividade serológica.....	241
4.5. <i>D. candida</i> (Solanaceae)	241
4.6. <i>U. membranosa</i> (Urticaceae).....	242
CONCLUSÕES	243
REFLEXÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	244
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	246
ANEXOS	254

AGRADECIMENTOS

Expresso um agradecimento muito especial aos orientadores desta dissertação, que acompanharam e prestaram todo o seu apoio no mesmo. Também a minha homenagem à sua visão e capacidade de trabalho bem como às sempre valiosas críticas e sugestões:

Professor Doutor Miguel Ângelo Pinheiro de Carvalho (Departamento de Biologia da Universidade da Madeira), e ao Professor Doutor Rui Manuel Almeida Brandão (Departamento de Biologia da Universidade de Évora).

A realização deste trabalho tornou-se possível também graças ao apoio e colaboração de várias pessoas e entidades:

A.E.M.M. – Associação para o Desenvolvimento de Estudos Médicos da Madeira

C.E.M. - Centro de Estudos da Macaronésia da Universidade da Madeira

Delegação Regional da Ordem dos Biólogos

Doutor Domingo Barber e Doutor Florentino Polo (ALK-Abelló, Madrid)

Doutora Dora Pombo (Laboratório de Ecologia e Sistemática da Universidade da Madeira)

Dr. César Pestana (Instituto de Climatologia e Meteorologia do Funchal)

Drs. Duarte Sardinha e Eng. Maria Moura (Laboratório de Qualidade Agrícola – Divisão de Protecção das Culturas, Núcleo de Micologia)

Dr. Fernando Drummond Borges e Dr^a Rita Câmara (Unidade de Imunoalergologia do Hospital Central do Funchal)

Dr^a Mónica Fernández (Departamento de Matemática, Universidade da Madeira)

Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade da Madeira, em particular, aos Dr. Fábio Reis e Dr^a Vânia Andrade

Dr. Raimundo Quintal (Associação dos Amigos do Parque Ecológico do Funchal)

Laboratório Regional de Saúde Pública do Funchal

Laboratórios Pharmacia Diagnostics – Portugal e Schering Plough

Luís Ferraz, Moisés Castro, Elmano e Rogério Correia (Universidade da Madeira)

SPAIC – Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica

Aos colegas, em especial ao Zé!, alunos (e estagiárias!), amigos, família e Roberto, pela *força e presença!*

ABREVIATURAS

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato

Bisacrilamida - N,N-metileno-bisacrilamida

BSA – Albumina sérica de bovino

g – unidade gravitacional

HCl– Ácido clorídrico

IEF – *Isoelectric Focusing*, focagem isoelétrica

IgE – Imunoglobina E

LMW – *Low Molecular Weight*, massa molecular baixa

M.O. – Microscópio Óptico

NBT – Nitro blue tetrazolium

PAGE – *Poliacrilamide Gel Electrophoresis*, electroferese em gel de poliacrilamida

PVDF – Polivinildifluorido

RAST – *Radioallergosorbent test*, teste radioactivo de sensibilidade alérgica

SDS – *Sodium Dodecil Sulphate*, dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Electroferese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SPTs – *Skin Prick Test*, Teste de Reactividade Cutânea

TEMED – N,N,N',N'-tetrametilenodiamina

Tris – Hidroximetil aminometano

TTBS – Tampão Tris Salino com Tween-20

Nota Introdutória

A problemática da doença alérgica constitui actualmente um tema incontornável, devido à sua importância e dimensão crescentes. A evolução desta doença tem acompanhado o desenvolvimento da sociedade humana, revelando-se mais preocupante nos países industrializados e desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento.

A evolução tecnológica e a modificação dos hábitos e estilos de vida são apenas alguns dos factores que têm condicionado a evolução das alergias. Temas não menos pertinentes como as alterações climáticas e globais são, ao mesmo tempo, uma consequência e condicionante do desenvolvimento humano. Todos estes factores acabam por estar directa ou indirectamente relacionados com a manifestação da alergia, revelando-se portanto, um problema complexo e multifactorial.

A abordagem à doença alérgica respiratória ganhou novas perspectivas graças aos conhecimentos e técnicas desenvolvidos no campo da Palinologia, Bioquímica, Biologia Molecular e mais recentemente, da Aerobiologia. Esta última constitui uma ciência interdisciplinar, tendo como objecto de estudo alguns dos principais agentes etiológicos da doença alérgica: os pólenes e os esporos de fungos. Trata-se de uma ciência emergente e com inúmeras potencialidades, não só no campo da Alergologia, como também noutras áreas do saber.

Recentemente, tem-se notado um esforço crescente na uniformização de técnicas e metodologias adoptadas nesta ciência bem como o recurso a novas tecnologias de monitorização de bioaerossóis em larga escala.

No que concerne à consolidação da Aerobiologia perspectivam-se progressos em vários sentidos:

- Na introdução desta disciplina nos currículos académicos, caso ainda inexistente;

- No reforço da interdisciplinaridade, pois tende a aumentar o contributo de áreas aparentemente não relacionadas;

- Na redefinição metodológica aliada à componente tecnológica e biotecnológica;

- Na consciencialização de que a doença alérgica respiratória terá uma nova forma de abordagem quando estão subjacentes conhecimentos e metodologias desenvolvidas por áreas afins à Alergologia e à Imunoalergologia.

Resumo

A abordagem da doença alérgica, nomeadamente da alergia respiratória, surge reforçada com o contributo da Aerobiologia no conhecimento, evolução e controlo da doença. Por seu turno, a caracterização bioquímica dos aeroalergénios de uma região permite avaliar a sua composição e potencial alergénico, com particular interesse para espécies vegetais cuja introdução e/ou proximidade a áreas populacionais, potenciam o aparecimento ou o aumento de sensibilização a aeroalergénios.

O trabalho apresentado nesta dissertação incidiu em duas vertentes de investigação distintas, porém complementares e interdependentes: numa primeira parte, no estudo da composição aerobiológica da atmosfera da cidade do Funchal no período 2002-2004 (Capítulo I), e numa segunda parte, na caracterização bioquímica dos alergénios polínicos mais frequentes detectados no referido período (Capítulo II).

Assim, numa primeira parte, a monitorização aerobiológica (incluindo pólenes, esporos de fungos e demais partículas de origem biológica), foi realizada com um polímetro do tipo volumétrico, tipo Hirst (Burkard). Os dados obtidos foram correlacionados com os parâmetros meteorológicos e avaliado o seu significado estatístico, permitindo antever a influência das variáveis ambientais em cada tipo particular de pólen e de fungo.

Constataram-se algumas diferenças no conteúdo aerobiológico comparativamente ao restante território nacional. No espectro polínico dominaram as Poaceae e Urticaceae, plantas ornamentais (Asteraceae, Boraginaceae, Cupressaceae) e as representativas da faixa norte da cidade (Ericaceae, Myrtaceae e Pinaceae).

Comparativamente a outras regiões do País, o espectro polínico foi no cômputo geral semelhante, embora se destaque para esta região, a expressividade do tipo *Corylus* no total polínico anual. A Primavera e o início de Verão, corresponderam às épocas de maior diversidade e concentração de pólenes.

As diferenças encontradas no espectro polínico da cidade do Funchal são explicadas por variáveis intrínsecas desta região, tais como a composição vegetal, a localização da cidade, condições geo-climáticas inerentes, e a influência dos parâmetros meteorológicos, nomeadamente a temperatura e humidade relativa. Verificou-se a ocorrência de um maior número de pólenes quando a humidade se situa entre os 50 e 60 %, com a precipitação e a velocidade do vento a atingir valores mais baixos.

A análise da variação intra-diurna observada revelou que há uma maior representação de pólenes entre as 11 e as 16 horas. Este estudo aerobiológico confere dados para o estabelecimento do primeiro calendário polínico da região e a definição de padrões de sazonalidade. Por seu turno, a fenologia dos principais tipos polínicos observados no Funchal permite definir um padrão anual de ocorrências polínicas.

Relativamente à aeromicologia, verifica-se que, durante o período de estudo foram observados esporos de fungos sobretudo na Primavera (particularmente em Abril e Maio), início do Verão e no Outono.

Os Deuteromicetes representaram a classe predominante, sendo *Cladosporium* o fungo mais abundante na atmosfera do Funchal, cujas concentrações mais elevadas ocorrem a humidades relativas de 40 a 70%. Tal como os pólenes, os esporos apresentam uma dinâmica de variação intra-diurna particular: ocorreram em maior concentração entre as 13 e as 15 horas, surgindo igualmente nas primeiras horas da madrugada e da noite.

O coberto vegetal do Funchal poderá afectar a aeromicologia local, na medida em que constitui um substrato importante para o crescimento de fungos, tal como as gramíneas que proliferam em quantidade e variedade ao longo de todo o ano.

Constatou-se a existência de correlação entre a ocorrência de alguns esporos de fungos e taxa polínicos mais frequentes na atmosfera do Funchal. A análise de Spearman sugere a existência de correlação entre a ocorrência de *Parietaria* com a de *Alternaria* e *Drechslera*. Os esporos de fungos, incluindo esporos de fetos constituem uma fracção significativa das partículas na atmosfera do Funchal, sendo cerca de 11 vezes superior à dos pólenes.

Na segunda parte do trabalho, o estudo bioquímico dos aeroalergénios polínicos implicou a optimização dos procedimentos de extracção, apurando-se três técnicas para a obtenção dos perfis proteicos de extractos de pólen desde a sua fonte natural. Esta análise permitiu detectar e identificar através das técnicas de SDS-PAGE-*Imunoblotting*, proteínas IgE específicas do pólen de plantas possivelmente relacionadas com a sensibilização alérgica.

Em consonância com a monitorização aerobiológica, foram preparados extractos de pólen de 10 espécies de plantas. Os resultados em SDS-PAGE revelaram um elevado polimorfismo proteico em todos os extractos. Obtiveram-se extractos de pólen de 7 plantas acerca das quais não se conheciam estudos desta natureza: *Acacia mearnsii*, *Avena barbata*, *Carduus squarrosus*, *Carlina salicifolia*, *Datura candida*, *Echium nervosum* e *Urtica membranosa*.

Por *imunoblotting* detectou-se no soro de dois pacientes IgE específica a proteínas de *D. candida*, com pesos moleculares entre $150,71 \pm 0,05$ e $58,92 \pm 5,67$ KDa. O soro de um deles reagiu igualmente com 5 alergénios de *P. pinaster* com $42,02 \pm 0,05$; $38,61 \pm 0,46$; $35,70 \pm 7,78$; $31,82 \pm 2,11$ e $27,45 \pm 0,46$ KDa. No soro de outro indivíduo foi detectada IgE específica para uma proteína de *A. mearnsii* com $66,66 \pm 0,13$ KDa, e outra de *C. squarrosus*, de $67,53 \pm 0,29$ KDa.

É de destacar a sensibilidade e fiabilidade da técnica de *Imunoblotting*, e o interesse em incluí-la na metodologia de diagnóstico complementar da alergia respiratória. A ampla difusão de espécies como *Ricinus communis*, *Urtica spp.* ou *A. mearnsii* e sua proximidade à presença humana, reforçam, por um lado, a importância da vigilância aerobiológica, e por outro lado, requer uma definição do seu carácter alérgico para a população desta região.

Abstract

The approach to allergic diseases, namely respiratory allergies, is strengthened with the contribution of Aerobiology in the knowledge, evolution and control of the disease. The biochemical analysis of the allergens from a certain region allow us to assess their composition and allergenic potential, with special emphasis on certain plant species which, when they are introduced near populated areas, potentate the growth of allergen sensitivity.

The work presented here on this thesis was based on two distinct research branches which are interdependent and complements of each other: from the first branch we have the study of Funchal city's atmospheric aerobiological composition during 2002 until 2004 (Chapter I) and from the second branch we have the biochemical characterization from the most common pollinic allergens detected during the same period (Chapter II).

On the first part we have the aerobiological monitorization (including pollens, molds and other biological particles) done with a volumetric polinometer, Hist type (Burkard).

Obtained data was correlated with meteorological parameters and assessed their statistical meaning, allowing a forecast from environmental parameters on each kind of pollen and mold. Some differences were found on the comparison from aerobiological contents from Funchal and mainland Portugal. On the pollinic range we found domination from Poaceae and Urticaceae, ornamental plants (Asteraceae, Boraginaceae, Cupressaceae) and from the city's north strip (Ericaceae, Myrtaceae e Pinaceae).

In comparison with other portuguese regions, the pollinic range in Funchal was similar although there is a big dominance from *Corylus* on the yearly pollinic total amount. The Spring and early Summer had the highest pollinic diversity and concentration.

Pollinic range differences found in Funchal are explained by region's specific characteristics like vegetal composition, city's location and subsequent geo-climatic conditions, and the influence of climate parameters, namely air temperature and humidity.

We found a higher pollinic concentration when the air humidity was around 50 to 60% and the rain and wind speed had their lowest values.

Analysis of intra-daily pollinic variation showed a higher pollinic concentration between 11 o'clock until 16 o'clock. This aerobiological study allows us to establish the first pollinic calendar for the region and to assess the seasonal pattern. Also the fenology of the main pollinic types found in Funchal allows us to draw a yearly pollinic pattern.

On the aeromicology side, it was found a higher molds spores concentration mainly during Spring time (namely April and May), and also beginning of Summer and Autumn.

Deuteromycetes were the dominating mold class and had *Cladosporium* as the most abundant mold in Funchal with the highest concentration occurring when air humidity was around 40 to 70%. Just like the pollens, the mold spores have a specific intra-daily

variation: they occur more abundantly between 13 o'clock until 15 o'clock and also during early night and dawn.

Funchal's vegetation may affect local aeromicrobiology as it is an important substrate for fungi growth, namely grasses which are abundant all year round both in species numbers and effectiveness.

We found a correlation between some molds and the most abundant pollinic *taxa* in Funchal. Spearman's analysis confirms that correlation, namely correlation of *Parietaria* with *Alternaria* and *Drechslera*. Mold's spores, including fern spores, are a significant part of Funchal's aerobiological particles, being 11 times bigger than pollens.

On the second part of this thesis, the pollinic allergen biochemical study demanded an optimization on the extraction procedures, being developed 3 techniques to obtain pollinic protein profiles. This analysis allowed us to detect and identify, through SDS-PAGE-*Immunoblotting* techniques, pollen specific IgE proteins which are possibly related to allergenic sensitivity.

In the sequence of the aerobiological information, protein extracts of ten species of plants were prepared. SDS-PAGE results revealed a high proteic polymorphism in all extracts. We've obtained pollen extracts from 7 plants, about whom there was no knowledge of this nature: *Acacia mearnsii*, *Avena barbata*, *Carduus squarrosus*, *Carlina salicifolia*, *Datura candida*, *Echium nervosum* e *Urtica membranosa*.

By immunoblotting, proteins of *D. candida* with molecular weights between $150,71 \pm 0,05$ and $58,92 \pm 5,67$ KDa were recognized by sera from two patients.

The sera of one of them also reacted with five allergens of *P. pinaster* with $42,02 \pm 0,05$; $38,61 \pm 0,46$; $35,70 \pm 7,78$; $31,82 \pm 2,11$ and $27,45 \pm 0,46$ KDa. In the sera of another individual it was detected specific IgE to an *A. mearnsii* allergen of $66,66 \pm 0,13$ KDa, and another one from *C. squarrosus*, with de $67,53 \pm 0,29$ KDa.

We focus the sensitivity and liability of this technique, and the interest to include it on the diagnostic methodology of the respiratory allergy. The broad diffusion of *Ricinus communis*, *Urtica spp.* or *A. mearnsii* and its proximity to humans, reinforce the importance of aerobiological vigilance as well as a definition of their allergenic character for these population.

OBJECTIVOS

Este trabalho teve como principal objectivo estudar a composição aerobiológica da atmosfera da cidade do Funchal no período 2002 a 2004 e proceder à caracterização bioquímica dos alergénios polínicos mais frequentes detectados durante esse período.

O facto de não existir estudos anteriores desta natureza na Região Autónoma da Madeira e dado o interesse e necessidade do estabelecimento deste tipo de estudos, motivou-nos para a sua realização.

A inclusão da análise aeromicológica e da caracterização bioquímica de aeroalergénios constituíram, simultaneamente, um desafio e um contributo em áreas de investigação ainda incipientes em Portugal.

Assim, os objectivos propostos para esta investigação foram os seguintes:

1. Caracterizar a composição aerobiológica da atmosfera da cidade do Funchal, nomeadamente de pólenes e esporos de fungos.
2. Definir os padrões de ocorrência dessas partículas ao longo do tempo e determinar os factores que influenciam a composição polínica e fúngica.
3. Inferir sobre as características alergológicas das partículas analisadas.
4. Estabelecer um modelo preditivo de ocorrência dessas partículas.
5. Analisar a fracção proteica de extractos de pólen. A selecção dos extractos baseou-se nos seguintes pressupostos:
 - 5.1. Pertencer a uma família cujos pólenes sejam frequente na atmosfera do Funchal.
 - 5.2. Constituir uma descrição nova na literatura no que concerne à caracterização bioquímica de extractos proteicos. A análise do polimorfismo proteico permitirá inferir sobre o seu potencial alergénico comparativamente ao de outros taxones descritos e taxonomicamente relacionados.

CAPÍTULO I - ESTUDO AEROBIOLÓGICO DA CIDADE DO FUNCHAL

INTRODUÇÃO

A doença alérgica representa uma das patologias mais comuns no mundo (Busquet et al, 2004). A alergia é um factor etiopatogénico de patologias que atinge diferentes órgãos e sistemas, em particular os que têm contacto com o ambiente exterior ao organismo humano. Trata-se de uma reacção de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos, estando frequentemente associada a asma, a rinite, a urticária ou a dermatite (Johansson, 2001).

As alergias surgem normalmente cedo na infância ou adolescência, podendo persistir ao longo da vida. Estimou-se que entre 2 a 15% da população europeia sofra de asma, e nalguns países, a alergia pode afectar até 50% da população infantil (Busquet et al, 2004). De acordo com o *European Allergy White Paper*, a prevalência total de rinite alérgica sazonal na Europa é aproximadamente 15% (Behrendt e Becker, 2001).

A prevalência das doenças alérgicas e da asma em particular é extremamente comum nos países desenvolvidos tendo vindo a aumentar nos últimos 20-30 anos (Eigenmann, 2005). Mais recentemente, observou-se um aumento similar nos países em vias de desenvolvimento, constituindo um problema de saúde pública. Há pouco tempo ainda eram desconhecidas as razões deste aumento especulando-se, entre outras hipóteses, da associação entre a sensibilização alérgica e a poluição do ar nos ambientes interior ("indoor") e exterior ("outdoor") (LETI, S.A, 1998).

Em análises multivariadas, verificou-se uma associação significativa entre o desenvolvimento das doenças alérgicas de origem atópica: factores genéticos (história familiar ou atopia), exposição a alergénios (pólenes, esporos, cão, gato, ácaros do pó da casa), exposição de poluentes do "indoor" (p.ex. fumo do tabaco) e do "outdoor" (emissão de gases provenientes da combustão de combustíveis fósseis) (Nunes e Ladeira, 2005).

Vários estudos revelam que a exposição a alergénios, quer do "indoor", quer do "outdoor", poderá ser um factor desencadeante da doença alérgica em indivíduos susceptíveis. Na maioria dos casos, as alergias podem ser controladas evitando-se, por um lado, o contacto com as substâncias causadoras, e por outro, monitorizando o ambiente e eliminando ou evitando os factores externos que possam desencadear o processo alérgico. Neste âmbito, diversos estudos descreveram a importância da monitorização ambiental afecta à população alérgica.

Depois dos ácaros, os pólenes são considerados os principais causadores de alergias. O pólen, sobretudo o produzido por plantas anemófilas, tem sido alvo de variados estudos, não só pela importância que tem para a agricultura, como também para a medicina (Frenguelli e Mandrioli, 1990). O estudo dos aeroalergénios polínicos e a dispersão dos agentes fitopatogénicos foram uma das primeiras aplicações da Aerobiologia.

A Aerobiologia é a ciência que estuda a dispersão atmosférica de partículas biológicas e o seu impacto no meio ambiente e nos organismos. Um dos principais objectivos dos estudos

aerobiológicos consiste na elaboração de mapas polínicos e a elaboração de modelos para prever a variação das concentrações polínicas atmosféricas (Frenguelli e Mandrioli, 1990; Minero et al, 1997; Frenguelli, 1998).

A incidência expressiva das Alergias na Região Autónoma da Madeira e a inexistência de trabalhos anteriores no âmbito da aerobiologia e bioquímica de alérgenos, orientou-nos para o desenvolvimento deste estudo.

A doença alérgica respiratória e a asma afectam seriamente o quotidiano dos pacientes, pela morbilidade e suas consequências, incluindo a utilização de serviços de saúde, pelo impacto nas funções cognitivas e redução do desempenho laboral ou devido ao absentismo. Tal se traduz num concomitante aumento dos custos directos e indirectos da doença alérgica, e na asma em particular.

Esperamos que este estudo constitua uma ferramenta de trabalho para todos os que se debruçam sobre a problemática da doença alérgica respiratória na R.A.M., na expectativa de deixar em aberto uma base de trabalho, receptiva às novas tecnologias e novas formas de abordagem ao objecto de estudo. Acresce ainda o contributo da aerobiologia no conhecimento, evolução e controlo da alergia respiratória bem como nos múltiplos âmbitos em que esta ciência possa dar o seu contributo.

1. Breve Análise Epidemiológica da Doença Alérgica

1.1. Incidência da Doença Alérgica. Panorama Internacional

A alergia constitui um importante problema de saúde pública. No mundo existem à volta de 100 milhões de alérgicos, somente na União Europeia há cerca de 20 milhões, e na Europa calcula-se que 22 milhões de pessoas sejam alérgicas (LETI, S.A, 1998; Ranzi et al, 2003). Contudo, a maioria dos estudos epidemiológicos têm tido lugar nos países ocidentalizados onde a prevalência da alergia foi dada como elevada e tendendo a aumentar (Arshad, 2003).

As mudanças climáticas e o aumento da poluição, tanto nos ambientes interiores, como no exterior, conduziram a esta situação, dado a qualidade de vida, sobretudo nos grandes centros urbanos, ser cada vez pior (D'Amato e Liccardi, 1994; Palma-Carlos e Inácio, 1998; D'Amato e Liccardi, 2002). Esta é também a tendência da população mundial devido a diferentes condicionalismos: genéticos, ambientais, nomeadamente a factores etiológicos como os pólenes e fungos, e de estilo de vida (Nilsson, 1990; Arshad 2003).

Recentemente têm surgido múltiplos estudos epidemiológicos referentes à prevalência destas doenças em grandes amostras populacionais, seguindo metodologias padronizadas. Para a realização destes estudos estão disponíveis vários modelos que têm permitido estabelecer comparações entre estudos internacionais multicêntricos (LETI, S.A, 1998). Estas metodologias permitem definir o panorama actual de algumas doenças alérgicas a nível mundial.

O conhecimento das características epidemiológicas da doença alérgica representa um dado útil, na medida em que poder-se-á evitar o contacto com os factores patogénicos e consequentemente melhorar ou prevenir a doença (Schlumberger, 1987). Actualmente, muitos países têm desenvolvido técnicas de avaliação das doenças alérgicas, quer em estudos epidemiológicos, quer na melhoria de detecção e diagnóstico e suas implicações nos custos a nível individual e social (Nunes, 2003).

1.2. Panorama Nacional

Portugal colaborou em dois importantes estudos epidemiológicos desencadeados a nível mundial e europeu: ISAAC - *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* e o ECRHS - *European Community Respiratory Health Survey*. O ISAAC surgiu no início dos anos 90 por um grupo de investigadores da Nova Zelândia que iniciou um trabalho epidemiológico sobre a prevalência de doenças alérgicas em populações de crianças em idade escolar. Este projecto teve a participação de determinadas faixas etárias da população em todos os continentes envolvendo a maioria dos países a nível mundial (Nunes e Ladeira, 2005). O ECRHS dirige a sua atenção à população adulta europeia dos 20 aos 44 anos e propõe-se avaliar a prevalência de asma e sintomas "asthma-like", os factores de risco associados à patologia e a variação do tratamento para a asma na comunidade europeia (LETI, S.A, 1998). A prevalência da asma brônquica em Portugal determinada pelo ISAAC e pelo *PAC Study - Portuguese Allergic Childhood Study* foi estimada para valores entre 11 % e 15 % na infância e adolescência, verificando-se valores um pouco mais elevados na idade adulta (Fonte: Direcção Regional de Estatística da Madeira).

Em Portugal, 5 a 8 % das doenças alérgicas são polinoses, constituindo a segunda maior causa de alergia respiratória depois dos ácaros do pó da casa. A causa mais frequente de polinose é devida ao pólen de gramíneas, seguida de Parietaria, Oliveira, Plantago e Artemisia (Palma-Carlos, 1995). Segundo os dados do ISAAC, a rinite polínica afecta 7,3% da população entre os 6 e os 7 anos, e 6,3 % na população entre os 13 e os 14 anos (LETI, S.A, 1998).

1.3. Epidemiologia da Alergia na Região Autónoma da Madeira (R.A.M.)

Considerando a realidade portuguesa há um número muito substancial de doentes alérgicos, situação que atravessa longitudinalmente todas as faixas etárias. As patologias alérgicas apresentam elevada prevalência na Região Autónoma da Madeira sendo responsáveis por uma elevada morbidade (Fig. I 1), com consequências na qualidade de vida dos doentes e repercussões sócio-económicas evidentes.

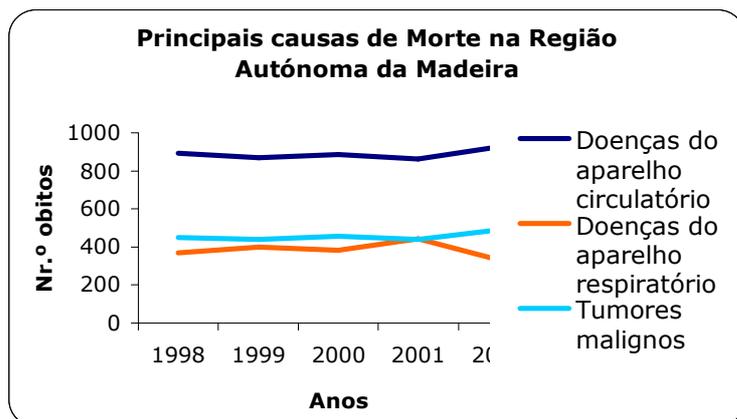


Fig. I 1. Principais causas de morte na Região Autónoma da Madeira, nos últimos anos (Fonte: Direcção Regional de Estatística da Madeira).

A Madeira é igualmente a região do País que apresenta uma prevalência e gravidade da asma mais elevadas. Os factores genéticos e ambientais parecem agir simultaneamente, resultando numa prevalência substancial das doenças alérgicas e da atopia (Morais de Almeida e Rosado Pinto, 1999). No Funchal, constata-se através do ISAAC – fase I índices de maior gravidade da asma brônquica que no restante território português (Morais de Almeida et al, 2001; Graça, 2003). A prevalência de sensibilização a pólenes determinada numa população de pacientes com rinite perianual da consulta de Imunoalergologia do Hospital Central do Funchal (H.C.F.) atinge os 64,7% para mais de 3 tipos de pólenes (Fig. I 2A).

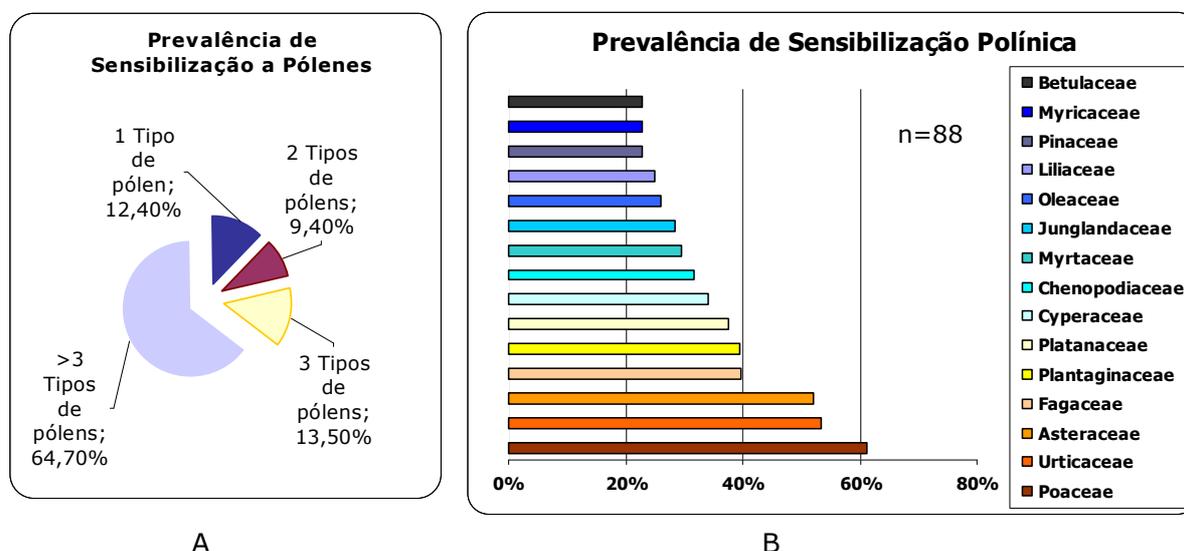


Fig. I 2. (A) Prevalência de sensibilização a pólenes no Funchal. (B) Percentagens de sensibilização aos pólenes mais frequentes (adaptado de Câmara et al, 2001b).

A sensibilização aos pólenes mais frequentes na atmosfera do Funchal atinge os 61,3% (Fig. I 2B), tendo-se verificado polisensibilização a aeroalergénios das famílias de pólenes mais prevalentes, nomeadamente Poaceae e Urticaceae, na ordem dos 47% e os 65% (Câmara et al, 2001b).

2. Monitorização Aerobiológica na Europa

A origem, transporte e deposição das partículas de origem biológica da atmosfera, nomeadamente pólenes e esporos de fungos, constitui o tema central da Aerobiologia.

Historicamente, as primeiras investigações surgiram em relação ao efeito dessas partículas na saúde humana, sobretudo ao nível respiratório.

Actualmente, a investigação Aerobiológica estende-se aos mais diversos âmbitos, da agricultura, à fito e zoopatogenia ou à poluição atmosférica.

Os estudos aerobiológicos na Europa têm vindo a desenvolver-se rapidamente, facto que se verificou sobretudo a partir dos anos 80, com destaque para as redes de monitorização aerobiológica que se estabeleceram em vários países.

Em 1985 o número de estações de monitorização aumentou, particularmente em Itália, Áustria e França, bem como a necessidade de cooperação inter-regional em estudos desta natureza. Neste sentido, a informação recolhida pelas diversas estações tem sido continuamente compilada para a elaboração de calendários polínicos a nível regional, nacional e europeu.

Os dados integrados na rede referem-se às recolhas efectuadas segundo metodologias padronizadas por um período de 3 a 5 anos. Os calendários integram uma selecção de dados de 15 tipos polínicos, onde 10 são seleccionados com base na abundância da sua ocorrência e/ou significado alergénico e 5 tipos adicionais, seleccionados a partir de 10 taxa alergenicamente menos importante ou aerobiologicamente menos frequentes.

A informação sobre a presença de pólenes e esporos de fungos na atmosfera numa dada região constitui um dado de interesse pelo facto do conhecimento das épocas de ocorrência dos pólenes e fungos no ar ajudar na interpretação do aparecimento de sintomatologia alérgica e na adopção de medidas terapêuticas mais adequadas (Spieksma, 1990; D'Amato e Spieksma, 1992; Sánchez-Mesa et al, 2002).

2.1. Estudos Aerobiológicos em Portugal

Os primeiros estudos aerobiológicos em Portugal surgiram de forma discreta e muito esporádica nos anos 50 e 60, com os trabalhos de Pinto da Silva, referentes às regiões de Sacavém, Lisboa e Porto. Desde 1978, o Instituto Botânico de Coimbra tem vindo a desenvolver estudos aeropalínológicos em diversas cidades, nomeadamente Lisboa, Porto, Coimbra e Aveiro (em Abreu et al, 2003). O espectro polínico na região de Braga foi analisado durante os meses de floração de *Vitis vinífera* em dois anos consecutivos (1999 e 2000) (Ribeiro et al, 2003). Durante a década de 80 e 90, foram realizados estudos esporádicos em Lisboa por métodos volumétricos (Clode et al, 1992). A partir de finais dos anos 80, Brandão e Lopes (1990) iniciaram análises aeropalínológicas dos principais centros urbanos do sul de Portugal, inicialmente por métodos gravimétricos, posteriormente por métodos gravimétricos

(Durham-modificado) e volumétricos (Hirst) (Brandão et al, 2004). Durante os anos de 1999 e 2000 funcionou em Portugal uma rede de monitorização polínica assente no método Cour e que abrangem a quase totalidade das capitais de distrito.

Através da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (S.P.A.I.C.) foi possível estabelecer as condições para a elaboração de um Calendário Polínico Nacional. Em 2000 foi criada a Rede Portuguesa de Aerobiologia (RPA) cujo centro coordenador se situa em Évora, integrando até ao momento a informação dos 5 postos de captação a operar ininterruptamente, são eles: Porto, Lisboa, Évora, Portimão e Faro.

A RPA, tal como as restantes redes europeias, adoptou a metodologia de monitorização estabelecida pela Rede Europeia de Aerobiologia, disponibilizando através dum portal on-line as previsões polínicas dos 8 dias seguintes bem como a distribuição polínica total dos postos de recolha.

No que concerne à monitorização aerobiológica regular na Região Autónoma da Madeira, a mesma iniciou-se em 1996 com o estabelecimento de um posto de captação na cidade do Funchal, o qual surgiu em parceria entre o Hospital Central do Funchal, a Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica, a Universidade da Madeira e o Instituto de Meteorologia do Funchal.

3. Pólen e Fungos como Bioaerossóis

3.1. Bioaerossóis

Os bioaerossóis são por definição, microorganismos, partículas, gases, ou fragmentos de origem biológica que ocorrem no ar. Cada partícula biológica ou agregado de partículas pode ter origem num substrato natural ou antropogénico. O solo, as plantas e as superfícies aquáticas, são particularmente profícuos na produção de bioaerossóis (Lugauskas et al, 2003). Em princípio, qualquer microorganismo pode constituir um bioaerosol. Os mais comuns em termos de abundância são os fungos, bactérias e vírus. Apesar dos microorganismos aquáticos, tais como as algas e protozoários, estarem mais confinados à água, também podem aerosolizar, especialmente durante condições de vento, chuva ou sob outra agitação física.

O meio atmosférico confere as condições para a dispersão biológica. A dimensão das partículas aerosolizadas podem variar entre os 0,5 μm e os 100 μm de diâmetro. As partículas de diâmetro superiores a 30 μm são normalmente aerosolizados por períodos de tempo relativamente curtos, dado a tendência de sedimentação das células de maiores dimensões.

Os pólenes de plantas anemófilas têm normalmente diâmetros de 17 μm a 58 μm , os esporos de fungos, entre 1 μm a 100 μm de diâmetro, as bactérias entre 0,25 μm a 10 μm , enquanto os vírus têm diâmetros geralmente inferiores a 0,3 μm (Jones e Harrison, 2004; Wittmaack et al, 2004).

A dimensão da partícula ou da célula pode constituir um factor de risco associado à contaminação microbiana. Em geral, quanto menor a partícula, maior o risco. Esta relação é devida ao facto das células e esporos de menor tamanho aderirem à mucosa e tecidos do sistema respiratório e de não serem facilmente expelidos. Por outro lado, os fragmentos celulares podem atingir dimensões muito inferiores aos das células intactas ou esporos, agravando o factor de risco.

O pólen e os esporos dos fetos são libertados das anteras e esporângios das plantas, respectivamente, por deiscência destes órgãos. Esta libertação pode ser de forma explosiva, de uma só vez, ou gradual, dependendo da planta em questão. Por esta razão, tais plantas são consideradas como centros emissores de partículas biológicas (Casas, 1995).

O pólen e os esporos de fungos estão no ar cumprindo a sua missão reprodutora. De todas as formas de polinização, a anemofilia representa a forma mais activa e homogénea de dispersão do pólen na atmosfera. Uma vez na atmosfera, as partículas aerovagantes estão sujeitas às mesmas leis que regem a dispersão e sedimentação das partículas em geral, com a sua correspondente velocidade de sedimentação, que depende da densidade da partícula, densidade do ar, viscosidade, etc. O grão de pólen, por seu turno, possui características intrínsecas particulares, relacionadas com a ornamentação ou ligadas à harmomegatia. Na prática, traduz-se numa forte sedimentação em condições de humidade (p.ex. chuva, nevoeiro), ou numa maior permanência e dispersão no ar, em condições mais secas que tornam o grão de pólen menos denso (Casas, 1995; Jones e Harrison, 2004).

3.2. Biologia do Grão de Pólen

O grão de pólen é a estrutura reprodutora masculina produzida na flor pelos estames, durante a reprodução sexuada da planta. Nas angiospérmicas, o grão de pólen maduro contém duas a três células, sendo o tipo triclular o mais comum. Este representa o gametófito masculino, dando origem ao elemento móvel que participa na fecundação do óvulo e formação do zigoto. Os processos de formação do gametófito, maturação do grão de pólen e constituição da parede polínica decorrem na antera. Esta estrutura por seu turno, diferencia-se em tecidos reprodutivos e não reprodutivos responsáveis pela produção e libertação do pólen. Os tecidos reprodutivos são constituídos pelos sacos polínicos (microsporângios), onde se encontram as células mães dos grãos de pólen (microsporócitos), as quais por divisões meióticas originam os micrósporos. Estes últimos por mitose transformam-se nos gametófitos masculinos. Os tecidos não reprodutivos da antera compreendem a epiderme, o endotécio, a camada média e o tapete, estando este último directamente envolvido no processo de microsporogénese (Bedinger, 1992).

3.2.1. Bioquímica do Grão de pólen

A composição química do pólen é variável entre as espécies. Os valores dos componentes oscilam entre os 13-17% de carboidratos, 11-20% de proteínas, 1-4% de lípidos e 1-2% de compostos inorgânicos. O conteúdo em água é relativamente elevado quando o grão de pólen está nas anteras, decrescendo rapidamente aquando da antese, tornando-se altamente higroscópico. A maioria das proteínas, normalmente enzimas, ocorre no citoplasma e na parede do grão de pólen, de modo a permitir o crescimento e alongamento do tubo polínico e subsequente fecundação. Contudo, esta disposição permite igualmente a interacção com o sistema imunitário (Knox e Suphiogu, 1996; Pettyjohn e Levetin, 1997).

3.2.2. Ultraestrutura versus Estrutura

Individualmente, os grãos de pólen possuem duas paredes. A mais interna, ou intina é de natureza pectocelulósica e a mais externa, a exina, composta por uma substância lipídica altamente resistente à degradação química, a esporopolenina, juntamente com pequenas quantidades de polissacáridos. A parede do pólen protege-o durante o transporte da antera ao estigma. A maioria dos pólenes possui aberturas cujo número, posição e características são normalmente fixos para cada tipo de pólen, embora possam ocorrer variações no número e tamanho, inclusive dentro da mesma espécie. As aberturas podem ter duas funções: por um lado, acomodar as alterações no volume do grão devido à hidratação e desidratação em função das condições atmosféricas (harmomegátia), e por outro lado, permitir a germinação do tubo polínico (Blackmore e Knox, 1990; Márquez et al, 1997).

3.2.3. Dimensão versus Polinização

O tamanho da maioria dos pólenes está compreendido entre 10 e 100 μm e a sua forma é esférica ou ovóide, embora ocorram outras formas. Exibem densidades e velocidades de sedimentação diferenciadas (Heibig et al, 2004), sofrendo adaptações na forma e tamanho segundo o seu modo de polinização.

Os pólenes mais pequenos de 20 a 40 μm e com baixo teor em água são em geral distribuídos pelo vento a largas distâncias (Emberlin, 1997). Em alergologia, os pólenes anemófilos têm grande importância pois com o seu baixo peso, mantêm-se no ar com facilidade, e são transportados pelo vento a grandes distâncias (Behrendt e Becker, 2001).

3.2.4. Factores de Distribuição

O tipo de pólen que pode "agredir" a população está condicionado pelo clima, a topografia e a vegetação da zona. A vegetação natural combinada com a actividade agrícola determina a mistura de pólenes existente no ar. A alergia ao pólen é estacional, coincidindo a manifestação

dos seus sintomas com o período de maior concentração de pólenes na atmosfera (Ross e Fleming, 1994).

As plantas identificadas como causadoras de alergia pertencem a três grandes grupos: árvores, arbustos e ervas. A sua distribuição varia de umas zonas para outras. Na Europa, esta variação é particularmente notável, por ser um continente complexo geograficamente e com uma ampla diversidade de espécies vegetais (D'Amato, 1998; Palma-Carlos e Inácio, 1998).

3.3. Os Esporos de Fungos

Os fungos são organismos eucariotas saprófitos primários e cosmopolitas. Durante muito tempo foram classificados no reino vegetal, actualmente, fazem parte do Reino dos Fungos (latim *fungus* pl.; fungi) que agrupa os cogumelos, os bolores, as leveduras e inúmeras espécies microscópicas.

Os fungos constituem um complexo grupo de organismos que ocorrem praticamente a qualquer latitude, clima e época do ano. Os esporos de fungos representam o maior componente dos bioaerossóis do ambiente interior ("*indoor*") e "*outdoor*" (Gonzalo et al, 1996; Torres, 2002).

Ao longo dos últimos anos têm-se observado progressos significativos no estudo do conteúdo aeromicológico dos ambientes "*in*"/"*outdoor*" e da capacidade patogénica dos propágulos fúngicos (Pico e Rodolfi, 2000).

3.3.1. Habitat

O habitat preferencial dos fungos é húmido e escuro, vivendo estes organismos à custa da digestão de material orgânico ou parasitando plantas e animais. Estes organismos são capazes de viver em ambientes com temperaturas amenas e não são sensíveis ao frio (Krouse et al, 2002; Rosado Pinto e Morais de Almeida, 2003).

A humidade é um factor indispensável ao seu crescimento, normalmente acima dos 60% de humidade relativa, tolerando mal os ambientes secos. Ao contrário das plantas, os fungos são incapazes de produzir clorofila e o seu próprio alimento, isto é, tal como os animais, são organismos heterotróficos. Tal como muitas bactérias, libertam enzimas hidrolíticas para digerir os substratos externos e assim absorver os nutrientes de que necessitam (Trabulsi, 1991; Krouse et al, 2002; Rosado Pinto e Morais de Almeida, 2003).

3.3.2. Distribuição

Os fungos são preferencialmente organismos terrestres, alguns são aquáticos (marinhos ou de água-doce), ocorrem no solo, nos vegetais, no ar, nos animais, no homem e nos detritos em geral. Muitas espécies são patogénicas para plantas e animais, outros vivem em simbiose

formando associações efémeras ou duradouras como é caso das micorrizas, líquenes ou agregados endófitos (Trabulsi, 1991; Krouse et al, 2002). A dispersão ocorre através do ar sob a forma de aerossóis e a sua agressividade para o homem depende em grande parte da sua dimensão, dado que as partículas com mais de 18 μm de diâmetro ficam retidas no tracto respiratório superior, enquanto que as partículas inferiores a 5 μm atingem os bronquíolos (Trabulsi, 1991; Platt-Mills e Solomon, 1998).

3.3.3. Importância

Os fungos são importantes para o homem, podendo ter um papel benéfico ou não. Uma das suas funções é a degradação da matéria orgânica complexa convertendo-a em compostos orgânicos simples. Desta forma o carbono, o fósforo e outros elementos entram nas cadeias alimentares e são colocados à disposição das plantas, herbívoros, e carnívoros, sendo os fungos a base desta cadeia alimentar, da qual o homem é parte integrante (Trabulsi, 1991). Os fungos dispersos através da atmosfera são susceptíveis de provocar doenças quando entram em contacto com as mucosas e a pele do homem. O número de partículas inaladas está directamente relacionado com a sua concentração no ar e, também, com a actividade diária dos indivíduos expostos. O tipo e gravidade da doença dependem do tempo e da dose de exposição, da susceptibilidade individual, do conteúdo enzimático e da capacidade antigénica de cada fungo (Platt-Mills e Solomon, 1998; Krouse et al, 2002; Rosado Pinto e Morais de Almeida, 2003).

3.3.4. Estrutura e Formas de Reprodução

Apesar da sua diversidade, os fungos apresentam um estilo de vida comum aliado a uma estrutura simplificada. De um modo geral o corpo dos fungos verdadeiros (Eumycota) (Tabela I 1) é constituído por duas partes bem diferenciadas: uma vegetativa, voltada para o desenvolvimento e absorção de alimentos e outra parte reprodutiva ou frutificativa, que se encarrega da propagação das espécies. Nesta última parte, surgem estruturas especiais de reprodução sexuada e assexuada, onde se formam os esporos (Fig. I 3). Todos os fungos conhecidos, com poucas excepções, têm origem em esporos, corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas. Quando os esporos germinam, necessitam de condições ambientais idênticas às das sementes, nomeadamente de calor e humidade elevados. A germinação consiste na saída de um ou mais filamentos finos, as hifas (Fig. I 4 A), que crescem e ramificam-se em todos os sentidos, formando no conjunto um micélio (Fig. I 4 B). Esta parte vegetativa desenvolve-se no solo, na matéria orgânica em decomposição e no interior de tecidos parasitados (Prescott et al, 1999).

Na maior parte dos fungos a produção de esporos ocorre em contacto com a água, daí a chuva, o orvalho e o nevoeiro constituírem factores que desencadeiam a libertação maciça de esporos (Ricci et al, 1995; Rosado Pinto e Morais de Almeida, 2003). Nalgumas espécies a libertação de esporos ocorre quando o tempo se encontra seco e ventoso. É através do ar que os esporos asseguram a sua disseminação (Krouse et al, 2002).

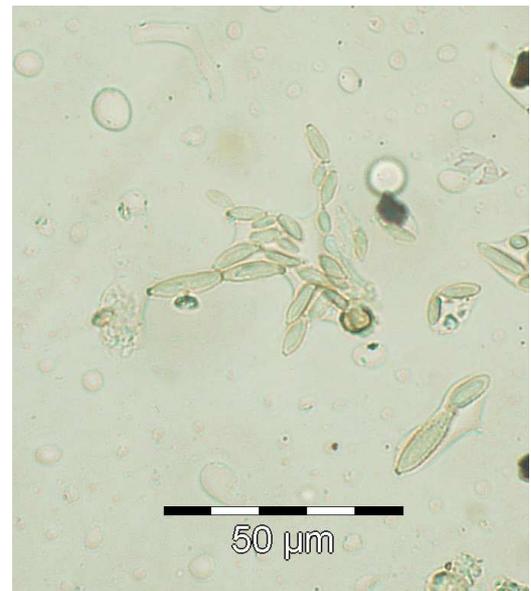
**A****B**

Fig. I 3. A. Reprodução assexuada, os esporos produzidos são libertados por ruptura ou aberturas do esporângio (seta). **B.** Esporos de *Cladosporium*. Fotografia ao Microscópio Óptico (400 X).

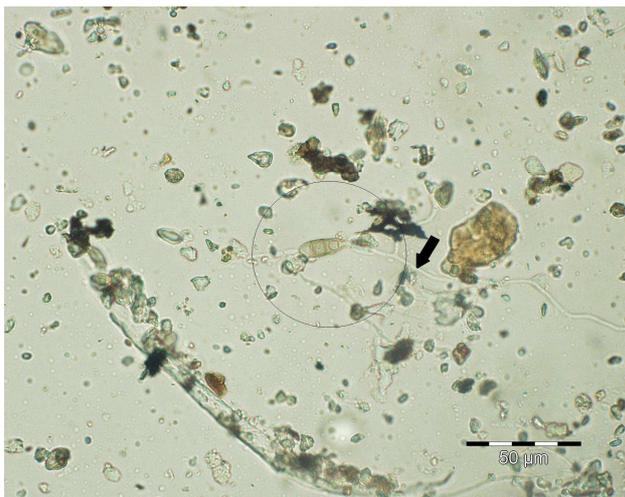
**A****B**

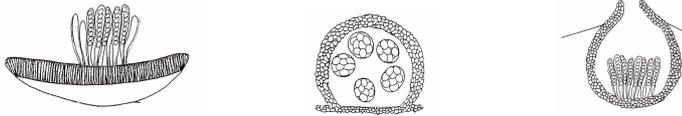
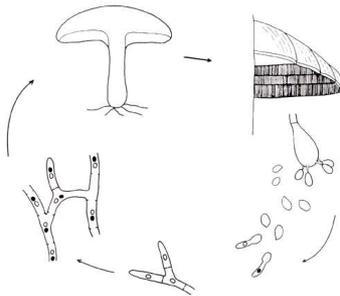
Fig. I 4. A. Germinação do esporo (círculo) e formação de hifas (seta) **B.** Micélio de aspecto difuso. Fotografia ao Microscópio Óptico (400 X).

Ocorre então uma diferenciação das hifas vegetativas, emergindo geralmente sobre o plano do micélio estruturas conhecidas por esporóforos, estrutura produtora e de suporte dos esporos. Os fungos podem ainda multiplicar-se através de fragmentação da hifa (Trabulsi, 1991).

3.3.4.1. Fases do Ciclo de Vida

A hifa representa o estado mais precoce do ciclo de vida do fungo. O estado de micélio é o estado dominante. Os fungos são normalmente classificados com base no estado sexual, tipo de frutificação e forma de dispersão dos esporos. No entanto, muitos fungos não atingem o estado sexual, a fusão de estruturas diferenciadas com carácter sexual origina os esporos sexuados. Em muitos fungos, não foi até agora reconhecida a forma sexuada de reprodução, sendo por isso incluídos entre os fungos imperfeitos (Watling, 2003).

Tabela I 1. Classificação dos fungos mais importantes (Adaptado de Watling, 2003).

Divisão	Subdivisão	Exemplos de Grupos	Principais Características
Myxomycota	Mastigomycotina	Fungos gelatinosos	Sem verdadeiro micélio, produzem um plasmódio nu, amebóide e multinucleado. Reprodução assexuada por zoósporos, e sexuada por formas diversas.
	Zygomycotina (Zigomicetes)	"Fungos-alfinete", ex: bolores	Com micélio contínuo (cenocítico). Com reprodução assexuada por esporos (aplanósporos) e sexuada pela formação de zigósporos. Células sexuais imóveis.
Eumycota (Fungos verdadeiros)	Ascomycotina (Ascomicetes)	Leveduras Líquenes Pedrado da macieira	Com verdadeiro micélio, septado (hifas vegetativas septadas ou de septo incompleto). Reprodução sexual evidente: esporos sexuais (ascósporos) produzidos em ascos, em múltiplos de 4, geralmente 8.  Diferentes tipos de ascos e ascocarpos (Adaptado de Deacon, 1984).
	Basidiomycotina (Basidiomicetes)	Cogumelos Leveduras Fungos ferrugem (Uredinales) Carvões de fungos (Ustilaginales)	Com verdadeiro micélio, septado (hifas vegetativas septadas). Reprodução sexual evidente: esporos sexuais (basidiósporos), produzidos em basídios, geralmente 4.  Representação em diagrama dos Basidiomycota. Ciclo de vida de <i>Agaricus</i> . (Adaptado de Deacon, 1984).
	Deuteromycotina Deuteromicetes ou Fungos Imperfeitos	Bolor cinzento dos frutos, (<i>Penicillium</i>) Antracnoses	Com verdadeiro micélio, septado (hifas vegetativas septadas). Estado sexuado é ainda desconhecido. Nesta categoria incluem-se a maior parte dos fungos de importância médica e fitopatogénica, bem como os ascomicetes e basidiomicetes, cujo estado sexual se desconhece.

3.3.5. Forma de Dispersão

O vento é um dos principais agentes de dispersão de esporos fúngicos, podendo estes ainda ser transportados no corpo de mamíferos, aves e de invertebrados. São normalmente leves e pequenos, podendo permanecer suspensos no ar por muito tempo, o que explica a sua ampla distribuição e a sua grande capacidade para provocar patologias no homem, nomeadamente doenças alérgicas (Rosado Pinto e Morais de Almeida, 2003).

3.3.6. Capacidade Alergisante

Os esporos de fungos são aeroalergénios muito frequentes, com grande capacidade de flutuação e uma dimensão que varia entre os 2 e os 20 μm de diâmetro. Esta dimensão facilita a sua inalação através da árvore traqueobrônquica, atingindo os esporos mais pequenos, os alvéolos (Krouse et al, 2002; Rosado Pinto e Morais de Almeida, 2003). Apesar do grande número de espécies de fungos contabilizado, somente cerca de 100 são responsáveis pelo aparecimento de doenças nos humanos, e destes, cerca de 70 constituem espécies alérgicas (Krouse et al, 2002).

3.4. Tecnologias de Monitorização de Bioaerossóis

O desafio actual no estudo dos bioaerossóis reside na sua medição e monitorização. Os bioaerossóis ocorrem no ambiente "indoor" e "outdoor", formando normalmente misturas complexas de variados componentes. Esses componentes podem ser viáveis ou não viáveis, formar aglomerados reconhecíveis ao microscópio, e caso sejam partículas viáveis, requerer meios de cultura, ou análises químicas para a sua quantificação (Lacey, 1995; Jensen e Schafer, 1998). A avaliação quantitativa de bioaerossóis tornou-se importante devido a uma série de aplicações na saúde e na indústria (Griffiths e Stewart, 1999).

Embora existam várias tecnologias e métodos precisos de medição das emissões de aerossóis, uma das dificuldades deve-se sobretudo à diversidade de organismos que podem ocorrer numa dada quantidade de ar (Burge e Solomon, 1987). O método de obtenção de amostras realiza-se consoante a finalidade do estudo, empregando-se normalmente um ou vários métodos de amostragem, não havendo até ao momento uma metodologia consensual (Lacey, 1995; Lee et al, 2004). Os aparelhos e dispositivos de captação podem ser de dois tipos: de deposição ou de impacto. Os primeiros baseiam-se na deposição gravitacional das partículas numa superfície horizontal que as retém, enquanto que no segundo tipo, a amostragem das partículas ocorre por impacto numa superfície sólida (Brandão, 2004). Os métodos de análise de bioaerossóis habitualmente utilizados baseiam-se no conceito de impacto. Distingue-se 5 métodos distintos de detecção de bioaerossóis e seus componentes: (i) técnicas de crescimento em cultura, (ii) microscopia (iii) técnicas bioquímicas e (iv) imunológicas (Lacey, 1995; Riediker et al, 2000, Wittmaack, 2004).

As novas tecnologias de detecção de bioaerossóis fundamentam-se nalgumas propriedades físicas e biológicas das partículas e resultaram da combinação e aperfeiçoamento de técnicas de óptica, de fluorescência e de citometria de fluxo (Grinshpun, 1996; Pan et al, 2003). São disso exemplo: o FLAPS (*Fluorescent Aerodynamic Particle Sizer*), o FPS (*Fluorescence Spectrometer*) e o ASM (*Aerosol Spectromete Mass*). As referidas técnicas de quantificação de partículas são as mais utilizadas e têm sido empregues na monitorização de concentrações de aerossóis no "indoor" e "outdoor" (Pan et al, 2003), figurando entre as técnicas promissoras na detecção e identificação de microorganismos (Ho, 2002).

3.5. Técnicas de Captação de Pólen e Esporos

A determinação da concentração atmosférica de grãos de pólen e esporos de fungos realiza-se com um equipamento desenvolvido inicialmente por Hirst em 1952. Trata-se de um captador de sucção que se baseia no princípio de impacto, com um orifício através do qual passa a amostra de ar que colide numa superfície em movimento. Nos finais dos anos 70 a Burkard desenvolveu o Burkard Seven Day Volumetric Spore-Trap®, colector baseado integralmente no método de Hirst. As vantagens do Hirst sobre os outros tipos de captadores residem na maior eficiência de captação, autonomia de funcionamento de uma semana e controle do volume de ar aspirado. Por outro lado, permite a aplicação de métodos de contagem de biopartículas com uma fiabilidade aceitável (Sterling et al, 1999; Belmonte et al, 2000; Cariñanos et al, 2000). Actualmente, o colector Burkard é utilizado nas Redes de Aerobiologia de todo o mundo (Subiza, 2001).

3.5.1. A Identificação dos Esporos de Fungos

Tal como acontece para os pólenes, a identificação dos esporos de fungos é efectuada ao microscópio a partir da análise de amostras do ar obtidas preferencialmente com colectores volumétricos. Apesar das limitações os estudos aeromicológicos resultam em informações importantes para diversas áreas de investigação. Estão identificados muitos fungos envolvidos em patologias alérgicas, podendo ser encontrados ao longo de todo o ano. Esta metodologia permite a calendarização destes aeroalergénios, sendo a informação obtida imprescindível na abordagem clínica dos doentes sensíveis a este tipo de alergénios (Gonzalo et al, 1996; Krouse et al, 2002; Rosado Pinto e Morais de Almeida, 2003).

3.6. Monitorização de Aerossóis a Larga Escala

A movimentação de aerossóis na atmosfera é um fenómeno comum aos organismos que utilizam o meio aéreo como forma de migração ou colonização. Trata-se de um elemento essencial à

sobrevivência e propagação das espécies, podendo estar confinado ao habitat ou abranger quilómetros de distância (Fuzzi et al, 1997; Gage et al, 1999).

O movimento e dispersão dos aerossóis de origem natural e antropogénica tem vindo a suscitar interesse desde as últimas décadas. Tal deve-se em parte ao seu efeito directo e indirecto no clima terrestre e consequente influência no sistema terra-oceano-atmosfera (Xue et al, 1999; Stegmann, 2004).

O transporte de poeiras do Norte de África a largas distâncias é um fenómeno que tem sido observado com particular atenção em diversas regiões, sobretudo no Atlântico Norte e Mediterrâneo (Chazette et al, 2001; Reis et al, 2002). Esse fenómeno é designado vulgarmente por “bruma” e pode ser visualizado do espaço quando atinge os Arquipélagos da Madeira e dos Açores (Fig. I 5-6). Vários estudos têm evidenciado a relação entre o aumento da frequência e intensidade das tempestades de poeiras e os efeitos adversos em ecossistemas marinhos e terrestres (Griffin et al, 2003; Weir-Brush et al, 2004). Trata-se de um fenómeno que apresenta mecanismos de transporte e variações sazonais peculiares surtindo impacto a vários níveis: na produtividade de fitoplâncton marinho; na ocorrência de marés vermelhas e no declínio de recifes de coral; na qualidade do ar e na saúde pública (Mattsson e Nihlén, 1996; Griffin et al, 2001; Querol et al, 2002; Viana et al, 2002; Qin e Oduyemi, 2003; USGS Open-File Report, 2003; Kellogg et al, 2004).

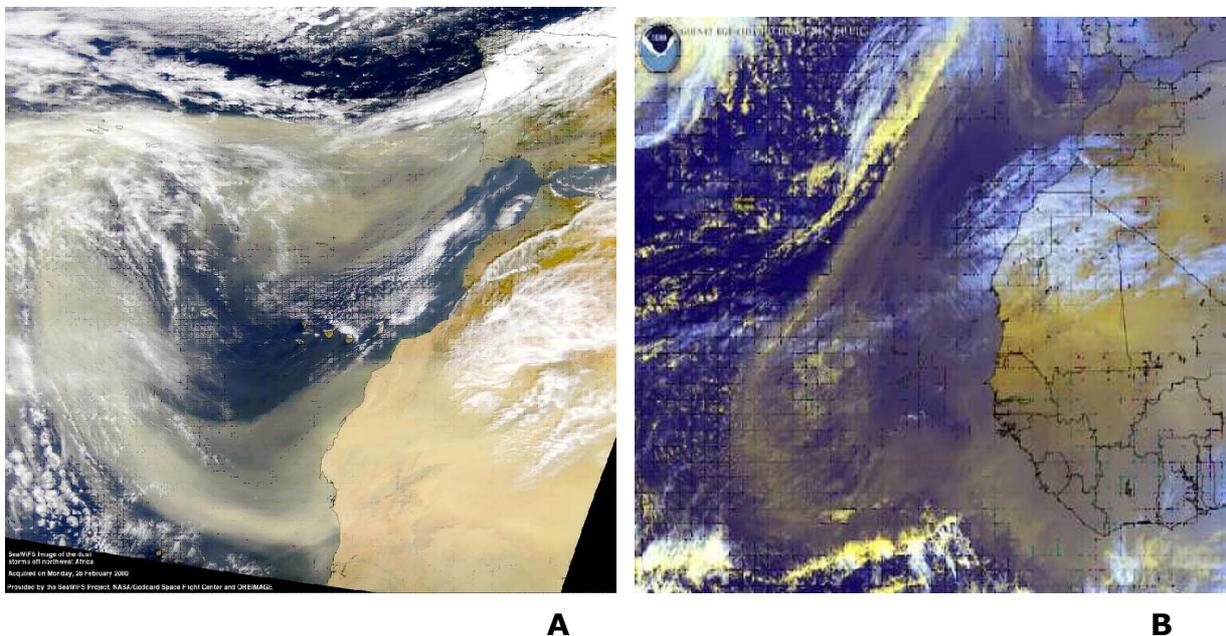


Fig. I 5. Imagens de satélite das tempestades de poeiras provenientes do Norte de África. **A.** SeaWiFS (26 de Fevereiro de 2000) **B.** NOAA (8 de Março de 2004). (Cortesia: Public Service Division - NASA, USA) (<http://www.nasa.org>).

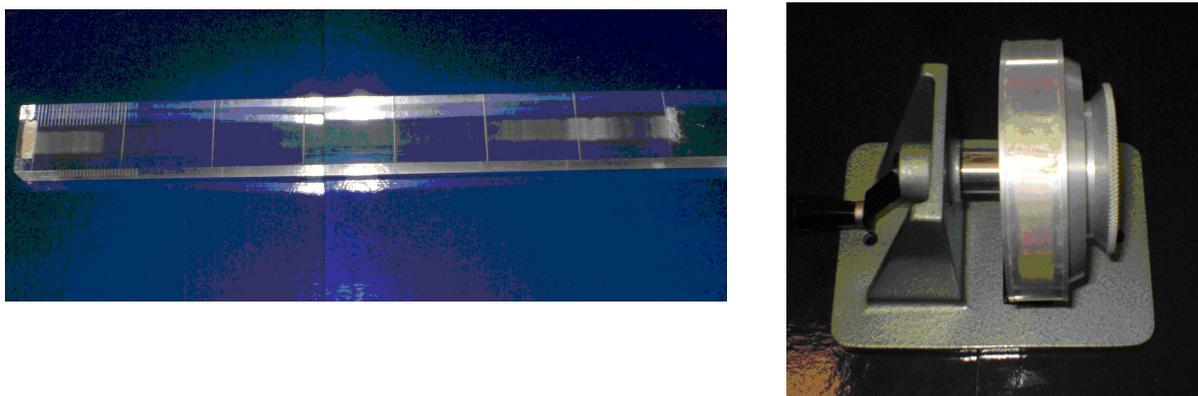


Fig. I 6. Aspecto da fita de melinex obtida no polinómetro do Funchal para o período 3 a 10 de Março de 2004. É visível a deposição acentuada de material na fita resultante da “bruma”.

3.7. Fenologia Vegetal versus Clima

Vários trabalhos têm demonstrado que as alterações ambientais estão na origem de modificações fenológicas (Newnham, 1999; Thibaudon e Lachasse, 2005). A poluição e as condições ambientais actuam sobre a vegetação influenciando a sua alergenicidade (D’Amato e Liccardi, 2002). O “*timing*” do início e pico de abundância de determinados tipos polínicos pode constituir um bio-indicador dessas alterações (Iannotti et al, 2000; Chehregani et al, 2004). Paralelamente, outros estudos têm demonstrado a concordância ou o desfazamento das épocas de floração, com as concentrações polínicas na atmosfera, e inclusive, com a ocorrência dos picos de actividade alérgica (Latorre, 1999; Zanotti e Puppi, 2000; Jato et al, 2002; kasprzyk, 2003). Neste sentido, a monitorização aerobiológica permite revelar os primeiros sinais da resposta da vegetação às alterações climáticas o que servirá para melhorar a previsão sobre o risco alérgico devido aos pólenes (Thibaudon e Lachasse, 2005).

Em suma, tratam-se de evidências que reforçam a importância da monitorização de bioaerossóis, nomeadamente a uma escala espaço-temporal ampla, somente possível com sensores remotos de satélite.

O modo de dispersão das partículas na atmosfera depende de factores meteorológicos que variam de ano para ano e de uma região para outra. Por esta razão, em vários países, na Europa inclusive, as redes de monitorização aerobiológica estabelecidas durante os últimos 10 anos têm servido de base a projectos e modelos de previsão da prevalência do pólen na atmosfera, a par dos programas de previsão meteorológica (Puls e Bock, 1993; Main, 2003; Jones e Harrison, 2004).

3.8. Modelos de Previsão

A previsão da concentração de pólenes na atmosfera constitui um dado informativo importante, na medida em que médicos e pacientes podem ser alertados da ocorrência da época polínica (Dahl e Strandhede, 1996; Minero e Fernández-Mensaue, 1996; Toro et al, 1998).

Os modelos de previsão desenvolvidos no âmbito da Aerobiologia podem prognosticar eventos a curto prazo (para um ou dois dias seguintes), ou para períodos mais longos, como o início e duração de uma estação polínica. Alguns dos trabalhos mais representativos que surgiram neste âmbito insidiram sobretudo na previsão do início e duração das épocas polínicas de Gramíneas, nomeadamente de Poaceae e Urticaceae (Toro et al, 1998; Schäppi et al, 1999), de *Betula* (Dahl e Strandhede, 1996) e *Olea* (Minero e Fernández-Mensaue, 1996; Galán et al, 2001a, 2001b).

Os modelos podem ser divididos em dois grupos: o primeiro grupo permite prever o início, duração e fim das épocas polínicas, com base no tratamento estatístico de variáveis meteorológicas até à determinação de valores de previsão, tais como a temperatura ou as unidades de calor acumuladas, necessárias para o despoletar da emissão do pólen (Galán et al, 2001a, 2001b; Ranzi et al; 2003, Helbig et al, 2004). É frequente a aplicação de regressões que correlacionam os parâmetros meteorológicos com as concentrações de pólenes e sua variação em determinadas sequências de tempo.

O segundo grupo, utiliza simulações numéricas das distribuições temporais e espaciais dos grãos de pólen. Para além das variáveis meteorológicas, podem incluir a fenologia da área de estudo, dados aerobiológicos anteriores e até mesmo os valores de produção de frutos de anos precedentes (Galán et al, 2004).

A adição de mais variáveis torna naturalmente a construção dos modelos mais complexa. No entanto, tem-se verificado bons resultados entre os valores esperados e os obtidos. A aplicação destes modelos também se estende ao incremento e optimização da produção de cultivares agrícolas (Galán et al, 2001b; Galán et al, 2004; Helbig et al, 2004).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Situação Geográfica e Características Geo-climáticas do Arquipélago da Madeira

A Madeira localiza-se entre as latitudes 32° 24' e 33 07' N e as longitudes de 16° 16' e 17°16' W, sendo a maior ilha do arquipélago localizado aproximadamente a 970 km a Sudoeste de Portugal continental e a 560 km de Rabat, na costa ocidental de Marrocos.

A Madeira, com 63 km de comprimento, 23 km de largura máxima e uma área de 736,75 km², apresenta uma cordilheira montanhosa ou maciço central com orientação Este-Oeste, onde se situam os pontos mais altos da ilha: Pico Ruivo (1862 m de altitude) e Pico do Areeiro (1810 m). A disposição desta cordilheira individualiza as vertentes norte e sul.

O relevo é muito acentuado, com vales profundos, gargantas estreitas, numerosos precipícios e arribas altas, resultantes sobretudo da erosão intensa causada pelas águas superficiais (Jardim e Francisco, 2005).

O clima na Madeira resulta da influência conjunta de vários factores, uns de carácter geral, outros local. Entre os primeiros, refira-se a latitude, a situação oceânica, os centros anticiclónicos continentais do noroeste de África e da Europa ocidental, o anticiclone dos Açores e os sistemas frontais associados aos centros de baixas pressões da Frente Polar. Nos factores de carácter local, sobressaem a altitude, exposição das vertentes à exposição solar e a influência dos ventos alísios. A vertente norte é mais exposta aos ventos dominantes, mais húmida, com maior pluviosidade e menor exposição solar do que a vertente sul.

A temperatura na costa sul da Madeira apresenta um valor médio de 18°C, que varia com a altitude, diminuindo aproximadamente 1°C por cada 150 m. A precipitação anual é de 400-1000 mm, enquanto que na costa norte, apresenta valores de 1000-2000 mm. A humidade atmosférica relativa é muito elevada em toda a ilha, podendo variar entre os 75-90% (Quintal, 2003).

2. Descrição da Área de Estudo

O estudo decorreu na cidade do Funchal que ocupa uma área de 76,3 km², onde se concentra o maior núcleo populacional da Madeira, cerca de 50% a 60% do total de residentes (Fig. I 7). A geomorfologia da paisagem em que a área urbana se implanta, surge como uma encosta de grandes dimensões, disposta em anfiteatro, delimitada a Sul pelo mar, a Norte pelo maciço montanhoso do Pico do Areeiro, a Este pelo complexo Ponta da Cruz-Pico dos Barcelos e a Oeste pelo Cabo de S. Gonçalo-Infante. A cidade tem vindo a expandir-se em direcção à montanha, delimitada por uma floresta predominantemente constituída por árvores exóticas –

pinheiros, acácias e eucaliptos – que substituíram as espécies indígenas existentes aquando do povoamento (Brandão, 1991; Neves, 1992; Quintal e Groz, 2001).



Fig. I 7. Localização da cidade do Funchal.

As três ribeiras que atravessam e estruturam a cidade do Funchal são elementos marcantes da paisagem, ligando a montanha ao mar e constituindo corredores verdes com variadas espécies da flora indígena e exótica. Entre as espécies indígenas, observa-se o vinhático (*Persea indica*), o til (*Ocotea foetens*), a faia das ilhas (*Myrica faya*) e a gingeira brava (*Prunus lusitanica*). Das espécies exóticas sobressaem os fetos arbóreos, os bambus, as casuarinas e as buganvíleas (Quintal e Groz, 2001).

A caracterização da paisagem assenta essencialmente em três factores:

I - Clima Submediterrânico, tipo oceânico e moderadamente chuvoso: **mediterrânico**, pois caracteriza-se por uma secura estival moderada, traduzida na existência de pelo menos um mês seco com precipitação inferior a 2,8 vezes à temperatura média mensal, **oceânico**, dado a diferença entre as temperaturas médias do ar dos meses mais quentes e do mês mais frio ser inferior a 10°C; **moderadamente chuvoso**, uma vez que a precipitação total anual é superior a 500 mm e inferior a 1000 mm, condições que favoreceram o desenvolvimento de plantas tropicais e subtropicais. Acresce ainda a sucessão de microclimas em altitude, fomentando uma variação da vegetação.

II – Existência de uma vegetação bastante diversificada, sendo constituída por taxa autóctones, inúmeras espécies exóticas e de fetos.

III – Integração das explorações agrícolas na malha urbana, notando-se inter-penetração da paisagem rural com a urbana (Quintal, 2003; Mesquita et al, 2004).

3. Período de Estudo

O estudo aerobiológico no Funchal decorreu entre 1 de Janeiro de 2002 e 31 de Dezembro de 2004.

4. Meteorologia Observada

Os dados meteorológicos relativos ao período em estudo foram gentilmente cedidos pelo Instituto de Climatologia e Meteorologia do Funchal.

As temperaturas médias mensais mostraram um padrão constante, ocorrendo um aumento gradual (cerca de meio grau centrígrado por ano), sobretudo da temperatura mínima (Fig. I 8-10).

As temperaturas mais baixas registaram-se em Fevereiro e Março, atingindo em média os 14°C vindo a aumentar progressivamente até os 28°C nos meses de Agosto e Setembro.

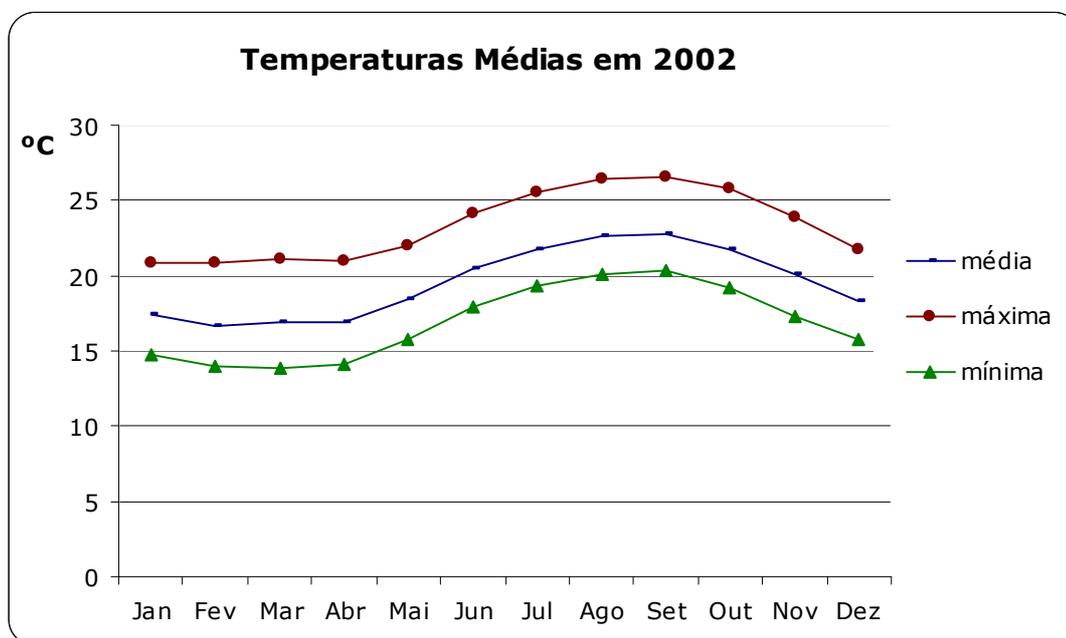


Fig. I 8. Temperaturas médias registadas durante o ano 2002.

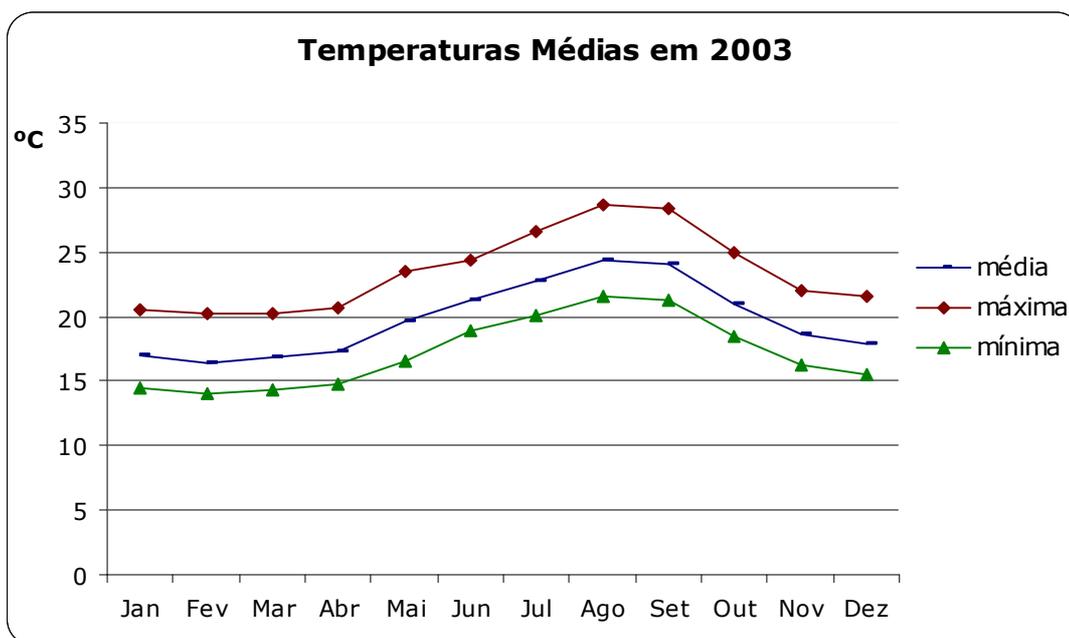


Fig. I 9. Temperaturas médias registadas durante o ano 2003.

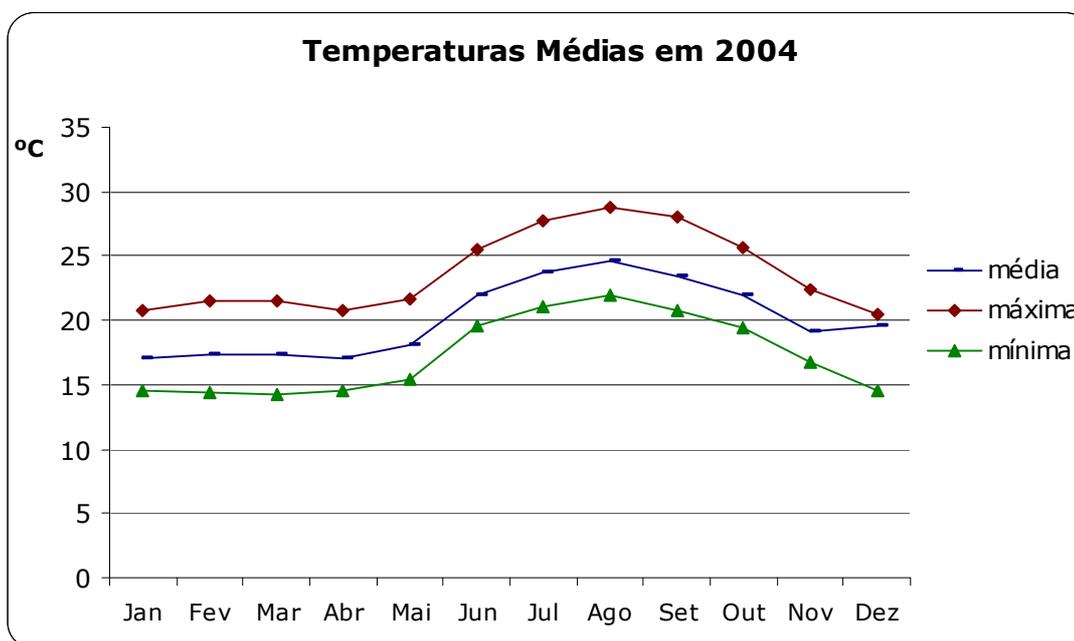


Fig. I 10. Temperaturas médias registadas durante o ano 2004.

A humidade relativa seguiu um padrão semelhante em 2002 e 2004, sendo 2003 o ano mais seco. Em Maio de 2002 registou-se a humidade média relativa mais baixa (49%), e em Outubro do mesmo ano, a humidade mais elevada (73%).

Os valores da precipitação foram muito baixos, ocorrendo sobretudo nos finais do Inverno e no mês de Abril. A precipitação reapareceu no início do Outono atingido em média os 3,5 mm (Fig. I 11-13).

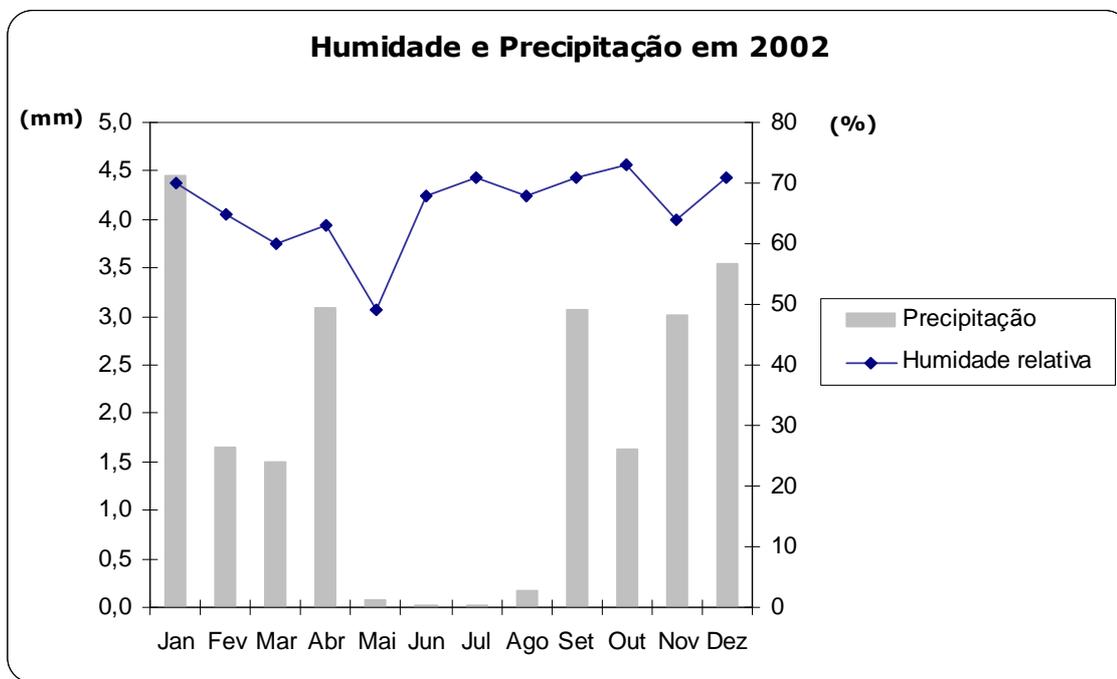


Fig. I 11. Humidade e precipitação registadas em 2002.

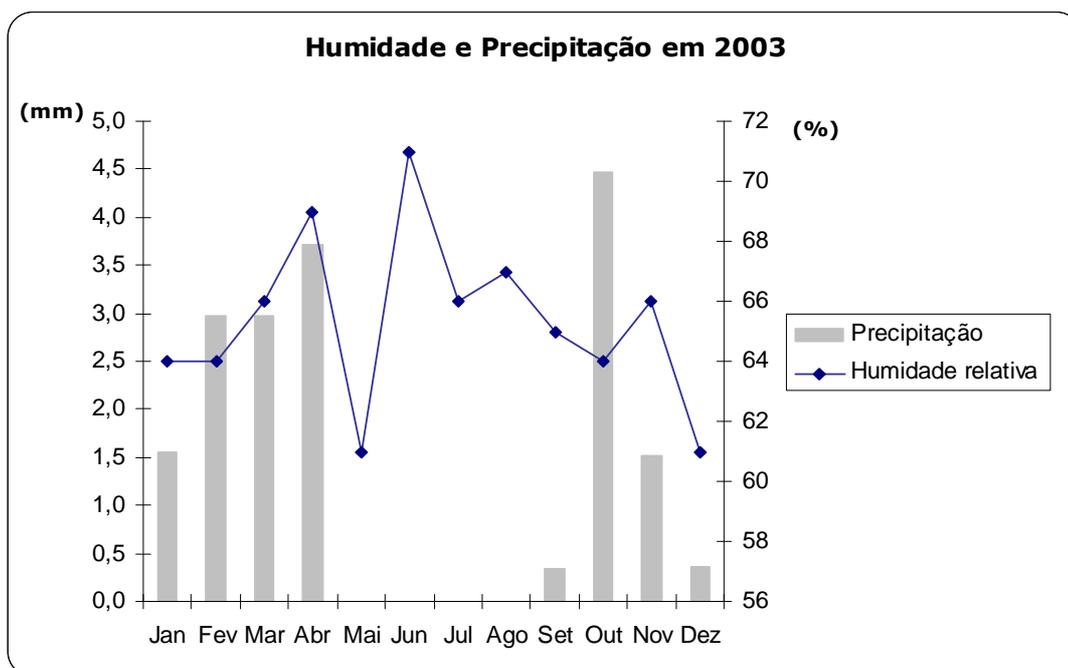


Fig. I 12. Humidade e precipitação registadas em 2003.

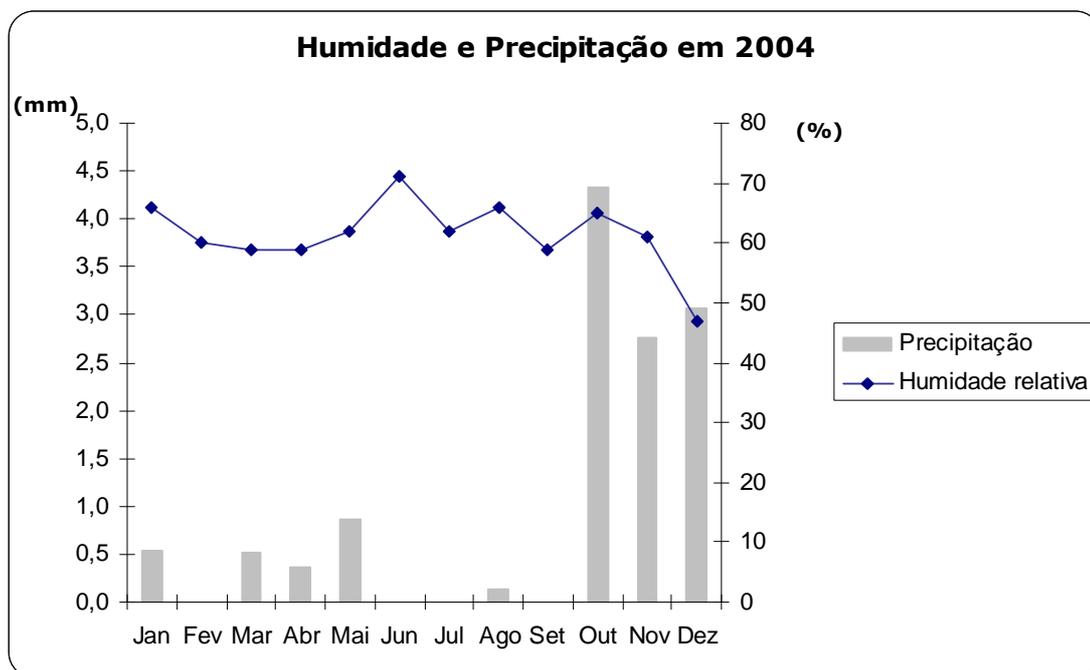


Fig. I 13. Humidade e precipitação registadas em 2004.

Os dados climatéricos cumulativos de 30 anos disponibilizados para a cidade do Funchal reportam ao período de 1961 a 1990. A temperatura e a precipitação médias foi de 18,7 °C e 641,2 mm, respectivamente (Fig.I 14.).

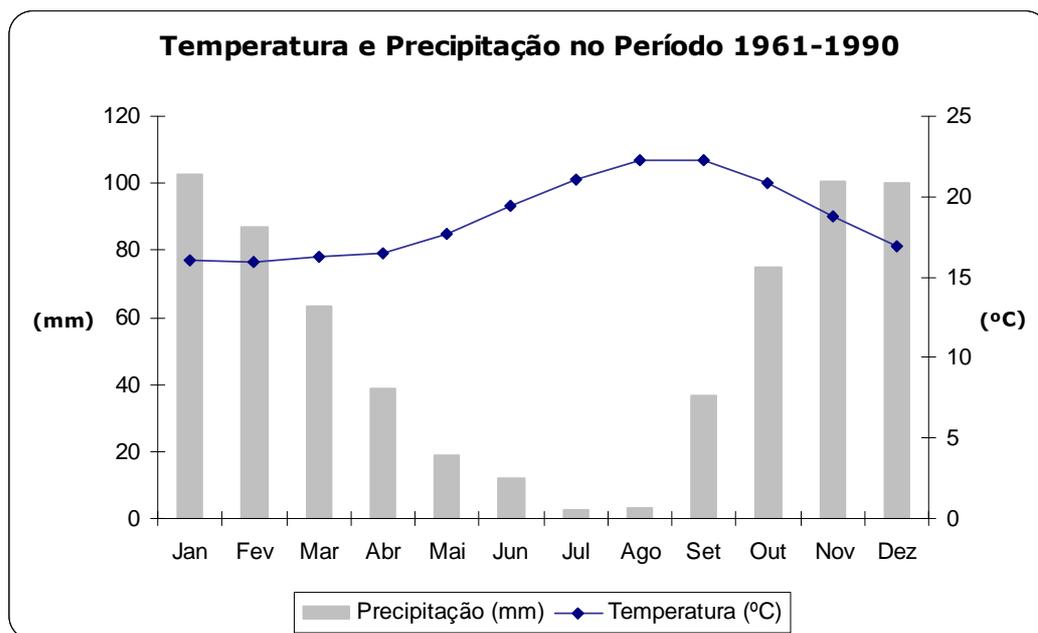


Fig. I 14. Temperatura e precipitação observadas num período de 30 anos.

A velocidade do vento apresentou um padrão regular no período em estudo, observando-se os valores mais baixos entre Junho e Julho na ordem dos 4,8 Km/h. Nos meses de Fevereiro e Dezembro o vento foi fraco a moderado, atingindo em média os 8 Km/h. O vento soprou sobretudo do quadrante Sudoeste (Fig. I 15 e 16).

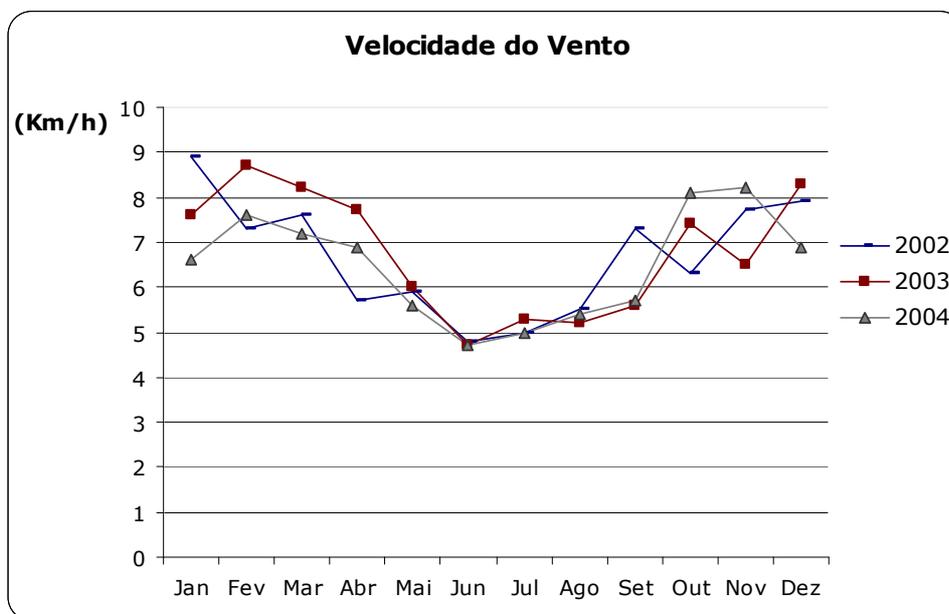


Fig. I 15. Velocidade do vento registada durante o período de estudo.

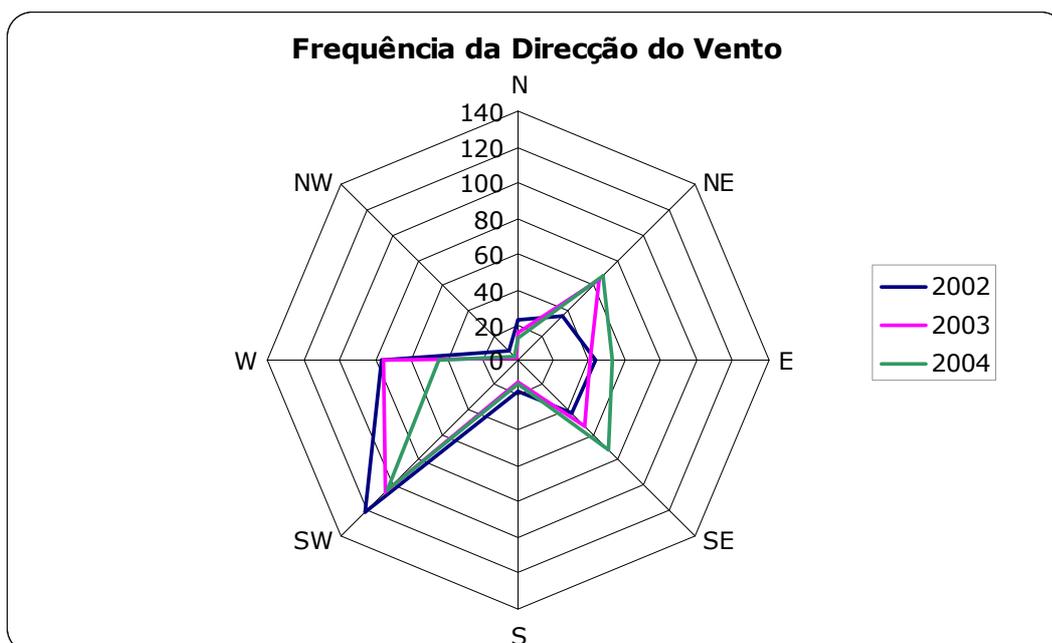


Fig. I 16. Frequência da direcção do vento predominante no Funchal no período 2002-2004 (Quadrantes: N – Norte, NE – Nordeste, NW - Noroeste, S – Sul, SE- Sudeste, SW - Sudoeste, E- Este, W – Oeste). (Valores apresentados em dias).

5. Método de Captação

Na captação das partículas aerovagantes da atmosfera foi utilizado um polinómetro tipo Hirst (Burkard). É um captador do tipo volumétrico, cujo modo de funcionamento e metodologia de análise seguem as normas recomendadas pela Rede Europeia de Aerobiologia.

O polinómetro está localizado a 10 m do solo no Instituto de Climatologia e Meteorologia do Funchal, a SE do centro do Funchal. O aparelho funciona a corrente eléctrica e é composto essencialmente por uma bomba que aspira um fluxo de 10 L de ar/min. O ar entra em contacto com um tambor contendo uma fita de melinex (14 mm X 336 mm) (Lanzoni) impregnada de solução de silicone (Lanzoni). O tambor está ligado a um mecanismo de relojoaria que o mantém a girar a uma velocidade de 2 mm/h durante 7 dias. Findo esse tempo, o tambor é retirado e substituído por outro contendo nova fita impregnada com solução de silicone.

No ano 2002 ocorreram duas falhas técnicas relacionadas com a bomba de sucção do polinómetro. Tal forçou a paragem do aparelho de 3 a 8 de Fevereiro, e de 6 a 12 de Maio. Uma vez reparado e calibrado, o polinómetro continuou a funcionar normalmente.

6. Tratamento das Amostras

O manuseamento das amostras decorreu numa área do laboratório sem correntes de ar e onde o espaço e os materiais utilizados foram mantidos limpos e destinados exclusivamente para esse fim. A fita de melinex foi desmontada do tambor, colocada sobre uma régua de acrílico (Lanzoni) e cortada segundo as divisões da régua, cada uma correspondendo a 24 horas de captação. Os pedaços foram transferidos para lâminas de vidro, previamente etiquetadas, contendo uma gota de água para facilitar a adesão das porções cortadas. Em seguida depositou-se duas gotas de glicerina-gel (Merck) com fucsina (Lanzoni) aquecida a 60° sobre a fita, e cobriu-se com a lamela. Após a montagem, a preparação foi colocada numa placa de aquecimento (Hoffer) a 30° exercendo-se uma ligeira pressão do centro em direcção aos lados da preparação com a ajuda de um estilete cilíndrico, de forma a facilitar a distribuição do corante por toda a superfície da amostra.

7. Análise Qualitativa

A identificação dos pólenes e esporos de fungos realizou-se com a ajuda do material de referência da Palinoteca *PALE*, montada para o efeito e através do recurso às seguintes obras: Faegri and Iversen (1989), Saa Otero et al (1996), Smith (1986a e 1986b) e Moore et al (1997).

8. Análise Quantitativa

As amostras foram observadas num microscópio óptico (Leitz) na objectiva de 40 X. Sobre a preparação foi colocada uma tira de acetato contendo um retículo com 24 linhas longitudinais distas 2 mm, e 4 linhas horizontais, distas 3 mm dispostas a partir do centro. Efectuaram-se 4 varrimentos horizontais e contabilizou-se o número de partículas por hora.

8.1. Conversão dos Resultados para Concentrações Horárias e Diárias

O tratamento das contagens passou por expressá-las em número de partículas por metro cúbico de ar. A concentração média diária de grãos de pólen ou esporos obteve-se multiplicando o número de partículas por um factor de conversão.

Para um dia tem-se em conta os seguinte dados:

- Dimensão da fita de melinex (14 mm X 336 mm), logo um dia corresponderá $336/7 = 48$ mm e à hora $48/24 = 2$ mm.
- O volume de ar que entra no captador (10 L/min), durante uma hora incidem $10 \times 60 = 600$ litros, e durante um dia 14400 litros. Como um metro cúbico equivale a 1000 litros, temos que $14400/1000 = 14,4$ m³/dia. A fórmula a aplicar surge como:

$$(C \times L) / (A \times C \times n \times 14,4), \text{ onde:}$$

C = comprimento da fita de melinex

L = largura da fita de melinex

A = amplitude do campo óptico a 40X (0,45 mm)

n = número de varrimentos (4)

(14,4 = fluxo de ar)

A ampliação da ocular utilizada foi de (10X). O valor do factor de conversão utilizado foi de 0,54.

9. Classificação Taxonómica dos Pólenes e Esporos de Fungos

A classificação taxonómica dos tipos polínicos¹ baseou-se na flora de Press e Short (1994). O critério de classificação adoptado para os esporos de fungos foi o seguido por Tomaz (2001). Os tipos polínicos e os esporos de fungos identificados foram posteriormente observados no microscópio óptico Olympus BX50 na objectiva de 40 X e fotografados com uma câmara digital Olympus DP11.

10. Análise dos Resultados

Apresentam-se os resultados tipo a tipo, onde os géneros polínicos surgem agrupados e ordenados por famílias, e os esporos de fungos, por classes. Foram considerados somente os pólenes e fungos cuja concentração observada ao longo do período de estudo fosse igual ou superior a 8 grãos (ou esporos) por m³ de ar por ano.

Os dados apresentados são expressos em grãos (ou esporos) por m³ de ar, quando não especificado outra unidade.

Ambos os conjuntos de fichas são precedidos por uma apresentação e análise global da ocorrência das partículas.

Os dados foram tratados no programa Microsoft Excel 2003 e através do programa SPSS versão 13.0.

A análise das frequências das médias horárias das partículas são representadas sob a forma de caixas de bigodes. Nesta representação, as barras representam intervalos de confiança (95%) do desvio padrão da média horária obtida durante os três anos.

A análise da correlação entre a ocorrência das partículas e as variáveis meteorológicas foi determinada através do coeficiente de correlação de Spearman dado as concentrações de pólenes e esporos de fungos não seguirem um modelo de distribuição normal (Mosteller e Rourke, 1993). Os cálculos foram efectuados tendo por base a concentração média diária das partículas e respectivos dados meteorológicos do dia. Os valores são expressos sob a forma de tabela, com um nível de significância de 0,05 %. Foi igualmente analisada a correlação entre os 20 tipos polínicos considerados nas fichas e os esporos de fungos.

Dado a evolução do número de partículas ao longo do tempo não ter sido linear impossibilitou-nos a concepção de um modelo predictivo de ocorrência. Em alternativa, procedeu-se à análise de agrupamentos, a qual procura classificar um conjunto de dados em grupos ou categorias, usando os valores observados das variáveis referentes ao fenómeno em estudo (Pestana e Gageiro, 1998).

Apresenta-se em seguida uma ficha tipo para os pólenes e para os esporos de fungos.

¹ O tipo polínico engloba todas as espécies com grãos de pólen morfológicamente iguais ou semelhantes, pertencendo ou não, à espécie do mesmo género (Arruda et al, 2005).

Tipo Polínico

Família e /ou **género**

Nome comum (quando identificável o género)

Porte (da planta de origem - herbácea, arbusto, árvore ou trepadeira)

Habitat e distribuição (da planta de origem)

Floração (período de floração)

Polinização (período de polinização)

MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma

Tamanho (quando é identificado o género)

Aberturas

Ornamentação

Alergenicidade

Calendário (calendário de ocorrência das partículas). O calendário representa o período de permanência de cada tipo de pólen ou esporo na atmosfera. O calendário coincide em geral com o período de polinização da respectiva planta.

Concentrações totais anuais, traduzem a soma total das concentrações diárias de cada ano.

Concentrações médias mensais, correspondem à média aritmética das concentrações diárias de cada mês.

Concentrações médias horárias, correspondem à média aritmética das concentrações horárias de cada dia.

Período de Polinização Principal (P.P.P.), deduzido de Nilsson e Persson (1981) em Minero et al (1997). Segundo estes autores, o referido período compreende 90% da concentração total anual, eliminando 5% no início e final do mesmo.

NOTA: Nas situações em que a concentração de pólen é considerada baixa, define-se o período ou a(s) data(s) de ocorrência do tipo polínico, no lugar do P.P.P..

Análise da correlação com as variáveis meteorológicas, com o coeficiente de correlação de Spearman. Variáveis analisadas:

Temperatura média diária (°C)
Temperatura máxima diária (°C)
Temperatura mínima diária (°C)
Humidade relativa diária (%)
Precipitação diária (mm)
Direcção do vento

Os quadrantes foram transformados em ângulos. As correspondências são as seguintes: Norte (360), Sul (180), Este (90), Oeste (270), Nordeste (45), Noroeste (315), Sudeste (135) e Sudoeste (225).

Tipo de Esporo**Género****Ordem****Classe****Subdivisão****Divisão****Distribuição****Morfologia dos esporos****Ecologia/Patogenicidade****Alergenicidade**

Calendário (calendário de ocorrência dos esporos de fungos). O calendário representa o período de permanência de cada tipo de esporo na atmosfera.

Concentrações totais anuais, traduzem a soma total das concentrações diárias de cada ano.

Concentrações médias mensais, correspondem à média aritmética das concentrações diárias de cada mês.

Concentrações médias horárias, correspondem à média aritmética das concentrações horárias de cada dia.

Análise da correlação com as variáveis meteorológicas, com o coeficiente de correlação de Spearman. Variáveis analisadas:

Temperatura média diária (°C)

Temperatura máxima diária (°C)

Temperatura mínima diária (°C)

Humidade relativa diária (%)

Precipitação diária (mm)

Direcção do vento

Os quadrantes foram transformados em ângulos. As correspondências são as seguintes: Norte (360), Sul (180), Este (90), Oeste (270), Nordeste (45), Noroeste (315), Sudeste (135) e Sudoeste (225).

RESULTADOS

1. Análise Polínica Global

O total de grãos de pólen contabilizado no período 2002-2004 na atmosfera do Funchal foi de 1.116,72/m³ de ar. Em 2003 registaram-se as concentrações mais elevadas de pólenes, 500,0 grãos/m³ de ar, 450,9 grãos/m³ de ar em 2004, e 164,7 grãos/m³ em 2002 (Fig. I 17).

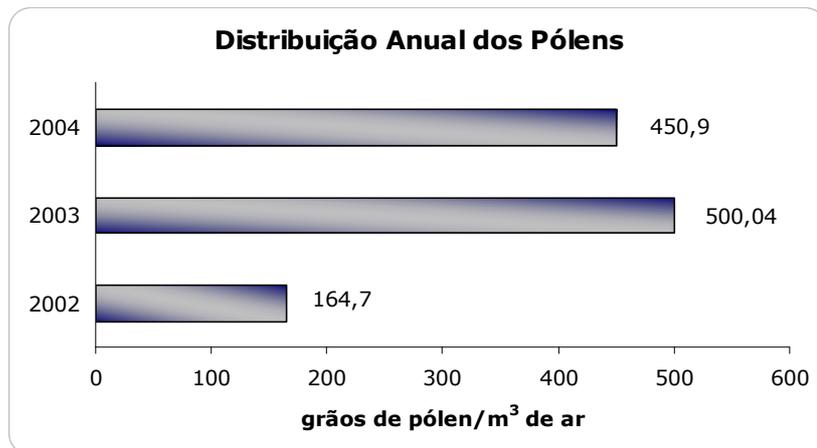


Fig. I 17. Totais Polínicos Anuais.

Os meses em que se observaram as ocorrências mais elevadas de pólenes foram Abril, Maio e Junho, totalizando 66,5% do total global. Maio foi o mês que apresentou os valores polínicos absolutos mais elevados, e Novembro, os mais baixos (Fig. I 18).

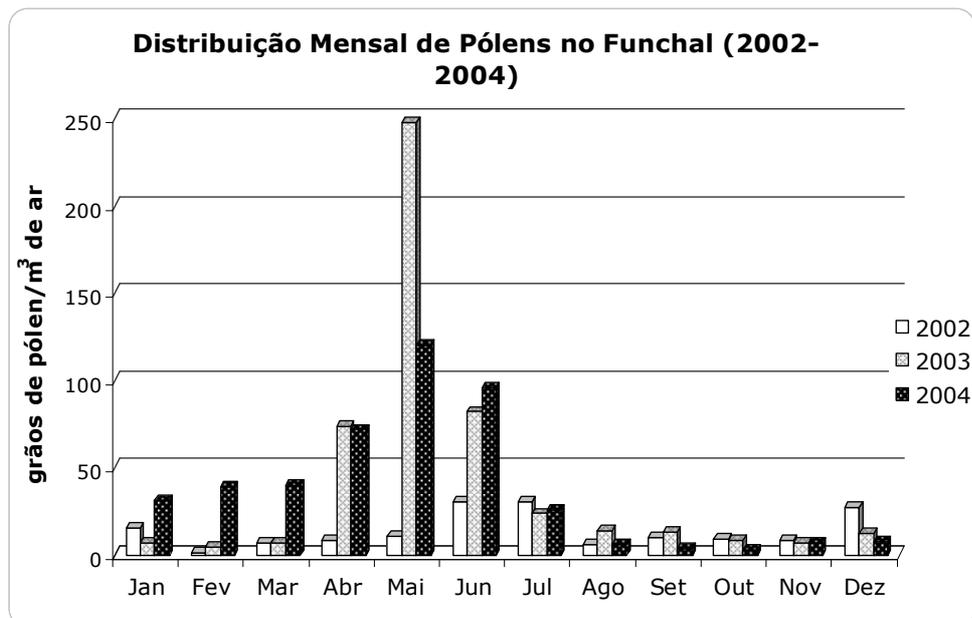


Fig. I 18. Flutuações mensais de pólenes na cidade do Funchal (2002-2004).

Em 2002 o dia em que se registou maior número de grãos de pólen foi a 8 de Julho (10,26 grãos/m³ de ar), em 2003 foi a 22 de Maio (25,92 grãos/m³ de ar), e em 2004 a 27 de Maio, com 15,66 grãos/m³ de ar.

A média anual das concentrações diárias de pólenes foi de 371,8 grãos/m³ sendo de 133 grãos/m³ nos meses de Maio e Junho.

Durante o período de estudo observou-se um total 48 *taxa*, distribuídos por 45 famílias, contabilizando-se em média 28 *taxa* por ano (Tabelas I 2 - I 5).

Tabela I 2. Contagens totais e contribuição percentual dos *taxa* em 2002 na cidade do Funchal

Taxa	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total	%
Apiaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	1,08	1,62	0,54	0	3,24	1,97
Asteraceae	0	0	0	0	0	0,54	2,7	2,16	3,24	2,7	1,08	2,16	14,58	8,85
<i>Artemisia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	1,08	0	1,62	0,98
Campanulaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	1,08	0	0,54	0	1,62	0,98
<i>Casuarina</i>	0	0	0	0	0	0	0	1,08	0,54	0	0	0	1,62	0,98
Chenopodiaceae														
Amaranthaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,4	5,4	3,28
Cistaceae	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	1,08	0,66
Corylaceae	6,48	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,54	8,1	4,92
Cupressaceae	2,16	0	0,54	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	3,24	1,97
Ericaceae	0,54	0	0	3,24	0,54	0	0	0	0	0	0	0,54	4,86	2,95
Fagaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	0	0,54	1,08	0,66
Ginkgoaceae	0	0	0	0	1,08	0	0	0	0	0	0	0	1,08	0,66
Juglandaceae	0	0	0	1,08	1,08	0	0	0	0	0	0	0	2,16	1,31
Malvaceae	0	0	0	0	2,7	0	0	0	0	0	0	0	2,7	1,64
Fabaceae	0	0	0,54	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0,54	1,62	0,98
Myrtaceae	2,7	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0,54	0	4,86	8,64	5,25
Nyctaginaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,08	1,08	0,66
Pinaceae	1,62	0,54	4,32	0	0,54	0	0	0	0,54	0,54	0	2,16	10,26	6,23
<i>Plantago</i>	0	0	0	0	0	0,54	0,54	0	0	0	0	0	1,08	0,66
Plumbaginaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,54	0,33
Poaceae	0,54	0	0	0,54	0,54	16,2	24,84	1,62	2,16	2,16	2,7	2,16	53,46	32,46
Rosaceae	1,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,08	2,16	1,31
Sapindaceae	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	1,08	0,66
Solanaceae	0	0,54	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0,54	4,86	6,48	3,93
Urticaceae	0	0	0,54	3,24	3,78	12,42	1,08	0,54	0,54	1,08	1,08	0,54	24,84	15,08
NI (Não identificado)	0	0	0	0	0	0,54	0	0,54	0	0	0	0	1,08	0,66
	15,7	1,62	6,48	8,1	10,8	30,8	30,2	5,94	9,72	9,18	8,64	27,5	164,7	

Os níveis polínicos mais elevados ocorreram no final do Inverno, Primavera e início do Verão. Essa altura coincide com a polinização de um maior número de plantas, nomeadamente dos *taxa* Pinaceae, Cupressaceae, Myrtaceae, Urticaceae e Poaceae (Fig. I 19).

Tabela I 3. Contagens totais e contribuição percentual dos taxa em 2003 na cidade do Funchal.

Taxa	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total	%
Apiaceae	0	0	0	0	0	1,62	0	0	0	0	0	0	1,62	0,32
Asteraceae	0,54	0	0,54	1,08	0	1,62	0	1,62	0	1,08	1,62	0	8,1	1,62
Boraginaceae	0	0	0	9,18	0	0	0	0	1,08	1,08	0	0	11,34	2,27
<i>Cardiospermum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0,54	0,11
<i>Casuarina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0,54	0,11
Chenopodiaceae														
Amaranthaceae	0	0	0	1,62	10,8	1,62	0	0,54	1,62	0	0	1,08	17,28	3,46
Corylaceae	0	0	0	0	43,2	8,64	0	0	0	2,7	1,62	0	56,16	11,23
Cupressaceae	0,54	0	0	3,24	8,1	0,54	0	0	0	0,54	0,54	1,08	14,58	2,92
Ericaceae	1,08	0	1,08	0,54	17,28	0,54	0,54	0	0	0	0	0	21,06	4,21
Euphorbiaceae	0	0	0	0,54	13,5	0	0	0	0	0	0	0	14,04	2,81
Ginkgoaceae	0	0	0	6,48	1,62	0	0	0	0	0	0	0	8,1	1,62
Lamiaceae	0	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0,54	0,11
Liliaceae	0	0	0	0	0	0	2,7	2,16	0	0	0	0	4,86	0,97
Fabaceae	0	0	0	0	2,16	0	0	0	0	0	0	0	2,16	0,43
Myricaceae	0	0	0	0	7,56	1,62	3,78	0	0	0	0	0	12,96	2,59
Myrtaceae	1,08	0,54	0,54	4,32	29,16	3,78	0	0	0,54	1,62	0,54	4,32	46,44	9,29
Nyctaginaceae	0	0	0	0	5,4	1,08	0	0	0	0	0	0	6,48	1,30
Onagraceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	0,54	0,11
Orquidaceaea	0	0	0	0	1,62	0	0	0	0	0	0	0	1,62	0,32
Passifloraceae	0	0	0	0	1,62	0	0	0	0	0	0	0	1,62	0,32
Pinaceae	0	0,54	2,7	1,62	5,4	0,54	0	0	0	0	0	0	10,8	2,16
<i>Plantago</i>	0,54	0	0	0	2,7	1,62	0	0	0,54	0	0	0,54	5,94	1,19
Platanaceae	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,11
Plumbaginaceae	0	0	0	1,08	0	0	0	0	0	1,08	0	0	2,16	0,43
Poaceae	1,62	2,7	1,08	8,64	8,1	11,88	8,1	0,54	1,08	0,54	0	1,62	45,9	9,18
<i>Robinia</i>	0	0	0	0	3,78	2,16	1,08	5,94	5,4	0	0	0	18,36	3,67
<i>Rumex</i>	0	0	0	0	1,62	0,54	0,54	0	0	0	0	0	2,7	0,54
<i>Salix</i>	0	0	0	0	1,08	0	0	0	0	0	0	0	1,08	0,22
<i>Senna</i>	0	0	0	0	2,16	0	0	0	0	0	0	0	2,16	0,43
Solanaceae	0	0	0	0	0	1,08	0	0	0	0	0	0	1,08	0,22
Ulmaceae	0	0	0	0	5,4	0	0	0	0	0	0	0	5,4	1,08
Urticaceae	1,08	0,54	0	32,94	73,44	42,66	7,02	3,24	1,08	0	2,16	2,16	166,32	33,26
NI (Não identificado)	0	0	0,54	2,7	1,62	0	0	0	0,54	0	0	1,62	7,02	1,40
	6,48	4,32	6,48	74	248	82,1	23,8	14	13	8,64	7,02	12,4	500,04	

Tabela I 4. Contagens totais e contribuição percentual dos taxa em 2004 na cidade do Funchal.

Taxa	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total	%
<i>Artemisia</i>	0	0	0	0	0	0	0	3,24	2,16	1,08	0	0	6,48	1,44
Asteraceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,54	0,12
Boraginaceae	1,62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,62	0,36
Chenop. Amar anthaceae	0	0	0,54	4,32	4,86	7,02	1,08	0	0	0	0	0	17,82	3,95
Corylaceae	0,54	2,16	2,7	9,72	9,72	4,32	1,08	0	0	1,08	0	0	31,32	6,95
Cupressaceae	2,7	2,16	11,34	11,88	5,4	2,7	1,62	0	0	0	1,08	1,62	40,5	8,98
<i>Cyca cyatea</i>	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,12
<i>Dianthus</i>	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,12
Ericaceae	0	0	1,62	2,16	24,84	11,34	0,54	0,54	0	0	0	0	41,04	9,10
<i>Ginkgoaceae</i>	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,12
<i>Jasminum</i>	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,12
Fabaceae	0	0,54	2,16	1,62	2,7	2,16	0	0,54	0	0	0	0,54	7,02	1,56
Myricaceae	0	0	0	1,62	0	0	0	0	0	0	0	0	1,62	0,36
Myrtaceae	4,86	1,08	5,94	3,78	5,4	8,64	1,08	0,54	0	0,54	1,62	1,08	34,56	7,66
Oleaceae	1,62	2,16	0	0	2,16	1,08	0	0	0	0	0	0	7,02	1,56
<i>Palmae</i>	0	0	1,08	1,62	3,24	0,54	0	0	0	0	0	0	6,48	1,44
Pinaceae	7,02	27,54	7,02	3,24	0,54	2,16	0	0	0	0	0	0,54	48,06	10,66
<i>Plantago</i>	0	0	0	1,08	2,7	1,62	1,08	0	0	0	0	0	6,48	1,44
Poaceae	2,16	1,08	0,54	1,62	12,42	21,06	14,58	0	0,54	0	1,62	0	55,62	12,34
<i>Robinia</i>	2,16	0,54	0	2,16	1,08	8,64	1,08	0,54	1,08	0	0	0,54	17,82	3,95
Rosaceae	0	0	0	1,08	0	0	0,54	0	0	0	0	0	1,62	0,36
<i>Rumex</i>	0	0	0	0,54	3,78	2,7	0,54	0	0	0	1,08	0	8,64	1,92
<i>Salix</i>	0	0	0	0	2,16	0	0	0	0	0	0	0	2,16	0,48
Solanaceae		0	0	1,08	0,54	0	0	0	0	0	0	0	1,62	0,36
Platanaceae		0	0	0,54	6,48	0	0	0	0	0	0	0	7,02	1,56
Musaceae	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,12
Urticaceae	7,56	1,62	7,02	23,76	30,78	20,52	2,16	0,54	0	0	1,08	2,7	97,74	21,68
NI (Não identificado)	0,54	0	0	0	0	1,62	0	0	0	0	0	0	2,16	0,48
	31,3	39,4	40	71,8	120	96,1	25,4	5,94	3,78	2,7	6,48	7,56	450,9	

No período em estudo os pólenes mais frequente pertenceram a Urticaceae correspondendo a 25,9% do total, seguido de Poaceae (13,89%) e Corylaceae (8,57%), como os mais prevalentes (Fig. I 20 – I 22, 23). O grupo designado “Diversos” inclui os grãos de pólen e partículas cuja concentração foi inferior a 8 grãos/m³ de ar. Os grãos não identificados ou “NI” variaram entre os 0,5 e os 1,40%.

Tabela I 5. Concentração do pólen e percentuais das diferentes famílias por ordem decrescente (2002-2004).

	Família	(grãos/m³ de ar)	%
1	Urticaceae	288,9	26,14
2	Poaceae	154,98	14,02
3	Corylaceae	95,58	8,65
4	Myrtaceae	89,64	8,11
5	Pinaceae	69,12	6,25
6	Ericaceae	66,96	6,06
7	Cupressaceae	58,32	5,28
8	Chenopodiaceae-Amaranthaceae	40,5	3,66
9	Papilionaceae	36,18	3,27
10	Asteraceae	31,32	2,83
11	Myricaceae	14,58	1,32
12	Euphorbiaceae	14,04	1,27
13	Plantaginaceae	13,5	1,22
14	Boraginaceae	12,96	1,17
15	Polygonaceae	11,34	1,03
16	Fabaceae	10,8	0,98
17	Solanaceae	10,8	0,98
18	Gingkoaceae	9,72	0,88
19	Nyctaginaceae	7,56	0,68
20	Platanaceae	7,56	0,68
21	Oleaceae	7,02	0,64
22	Palmae	6,48	0,59
23	Ulmaceae	5,4	0,49
24	Apiaceae	4,86	0,44
25	Liliaceae	4,86	0,44
26	Rosaceae	3,78	0,34
27	Salicaceae	3,24	0,29
28	Malvaceae	2,7	0,24
29	Plumbaginaceae	2,7	0,24
30	Aceraceae	2,7	0,24
31	Caesalpinaceae	2,16	0,20
32	Juglandaceae	2,16	0,20
33	Casuarinaceae	1,62	0,15
34	Campanulaceae	1,62	0,15
35	Orquidaceae	1,62	0,15
36	Passifloraceae	1,62	0,15
37	Cistaceae	1,08	0,10
38	Fagaceae	1,08	0,10
39	Sapindaceae	1,08	0,10
40	Caryophyllaceae	0,54	0,05
41	Cycadaceae	0,54	0,05
42	Lamiaceae	0,54	0,05
43	Onagraceae	0,54	0,05
44	Sapindaceae	0,54	0,05
45	Musaceae	0,54	0,05
	NI (Não identificado)	11,34	1,03
	Total	1116,72	

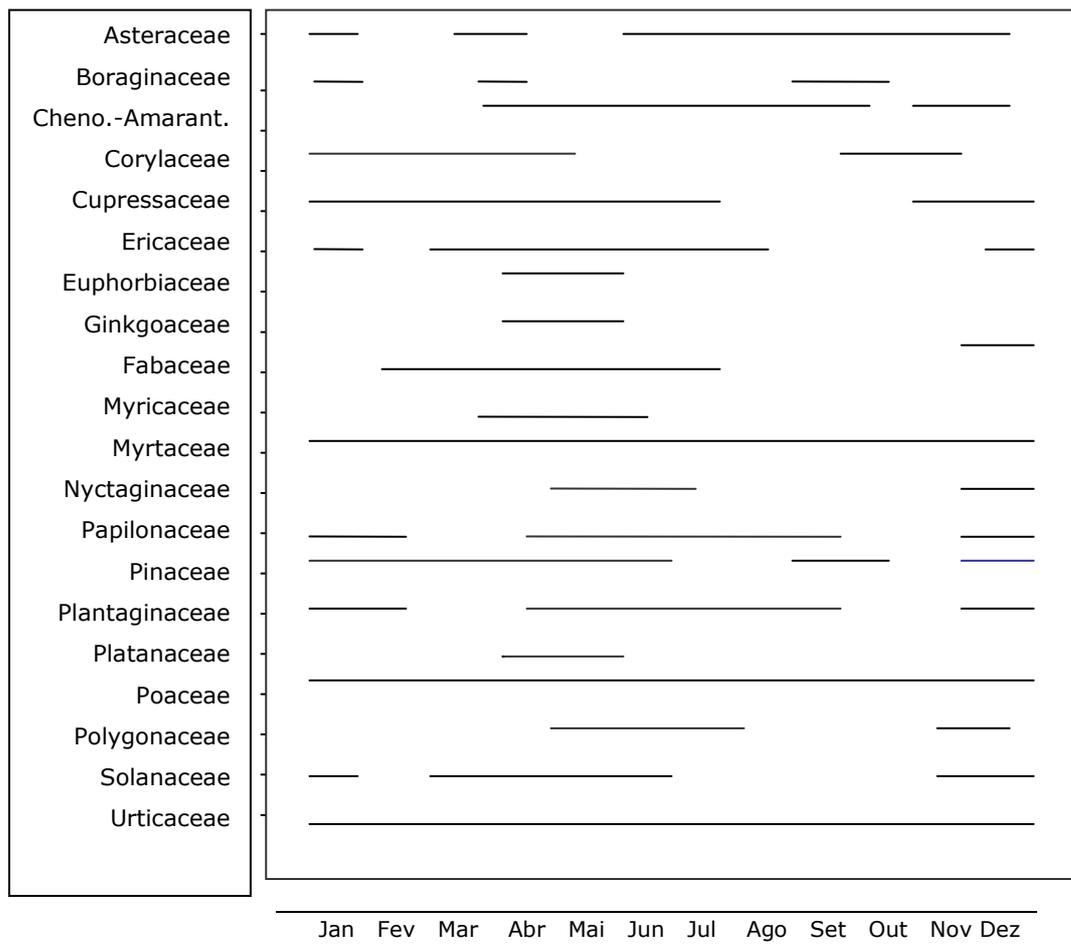


Fig.I 19. Fenologia dos principais tipos polínicos considerados no estudo (2002-2004).

Os tipos polínicos predominantes na cidade do Funchal correspondem a plantas de porte herbáceo (42,6%) ou arbóreo (37,3%) e em menor proporção, aos derivados de arbustos (19,2%) (Fig. I 21).

As variações polínicas foram semelhantes, verificando-se uma constância nos tipos polínicos que foram surgindo na atmosfera, sobretudo entre 2003 e 2004, e ao nível dos tipos polínicos principais (Fig. I 22 - 23).

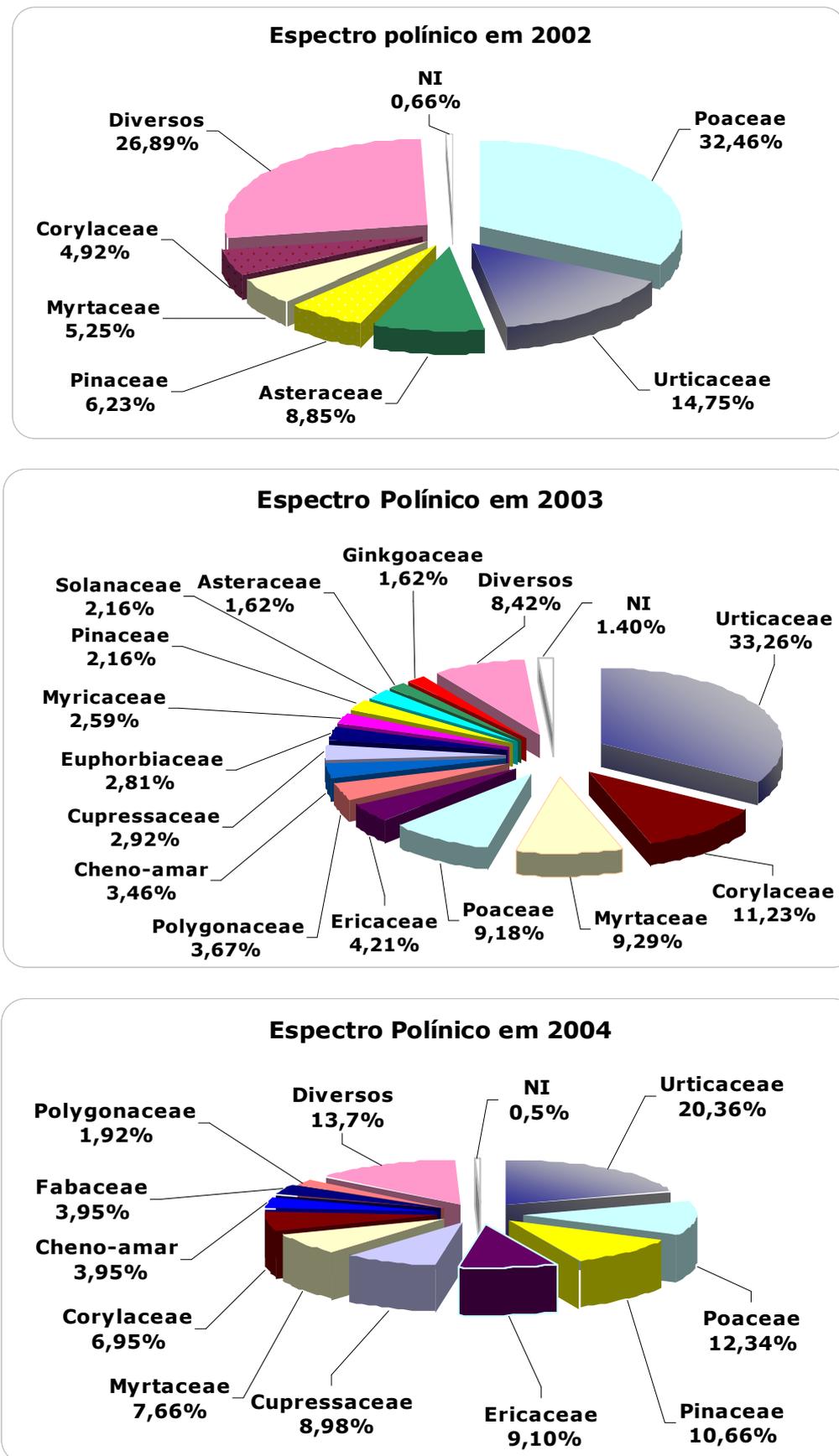


Fig. I 20. Espectro Polínico observado em 2002-2004.

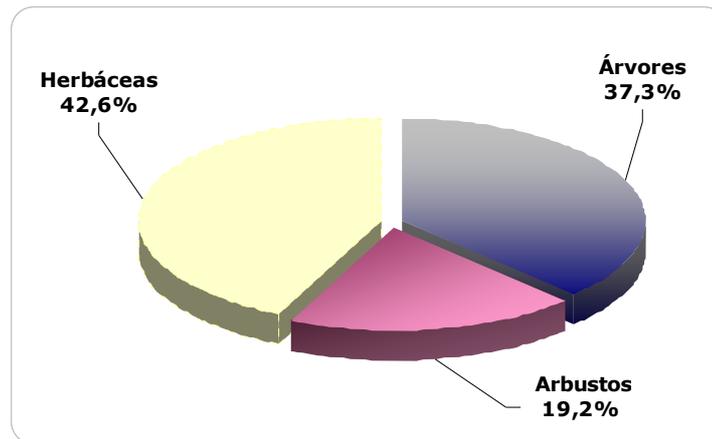


Fig. I 21. Percentagens de representação de grãos de pólen provenientes de árvores, arbustos e herbáceas na cidade do Funchal (2002-2004).

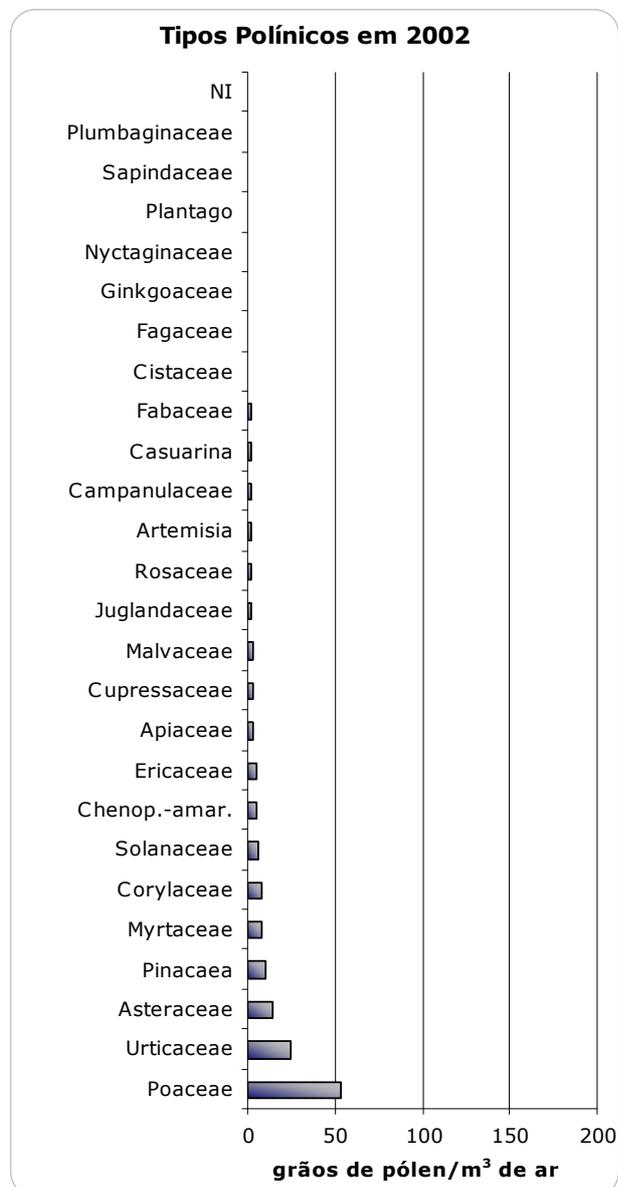


Fig. I 22. Proporção dos tipos polínicos identificados em 2002.

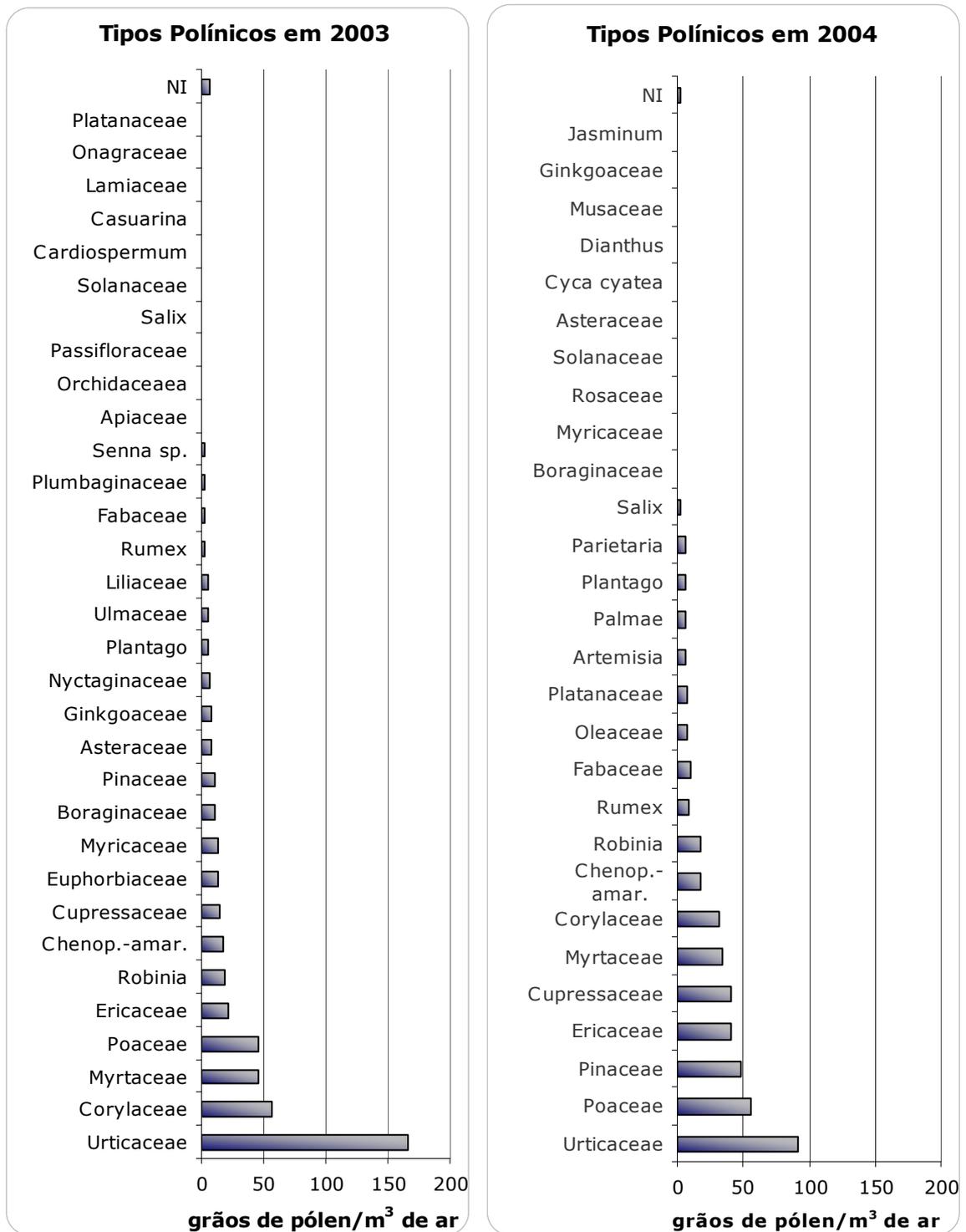


Fig. I 23. Proporção dos tipos polínicos identificados em 2003 e 2004.

Variações horárias

As médias das frequências horárias dos pólenes foram mais elevadas às 7, 16 e às 20 horas em 2002, e entre as 12 e as 15 horas, em 2003. Em 2004, o padrão de frequências foi irregular, contabilizando-se partículas ao longo de todo o dia, sobretudo ao final da manhã (10-11 horas), às 16 horas, reaparecendo um pico às 21 horas (Fig. I 24).

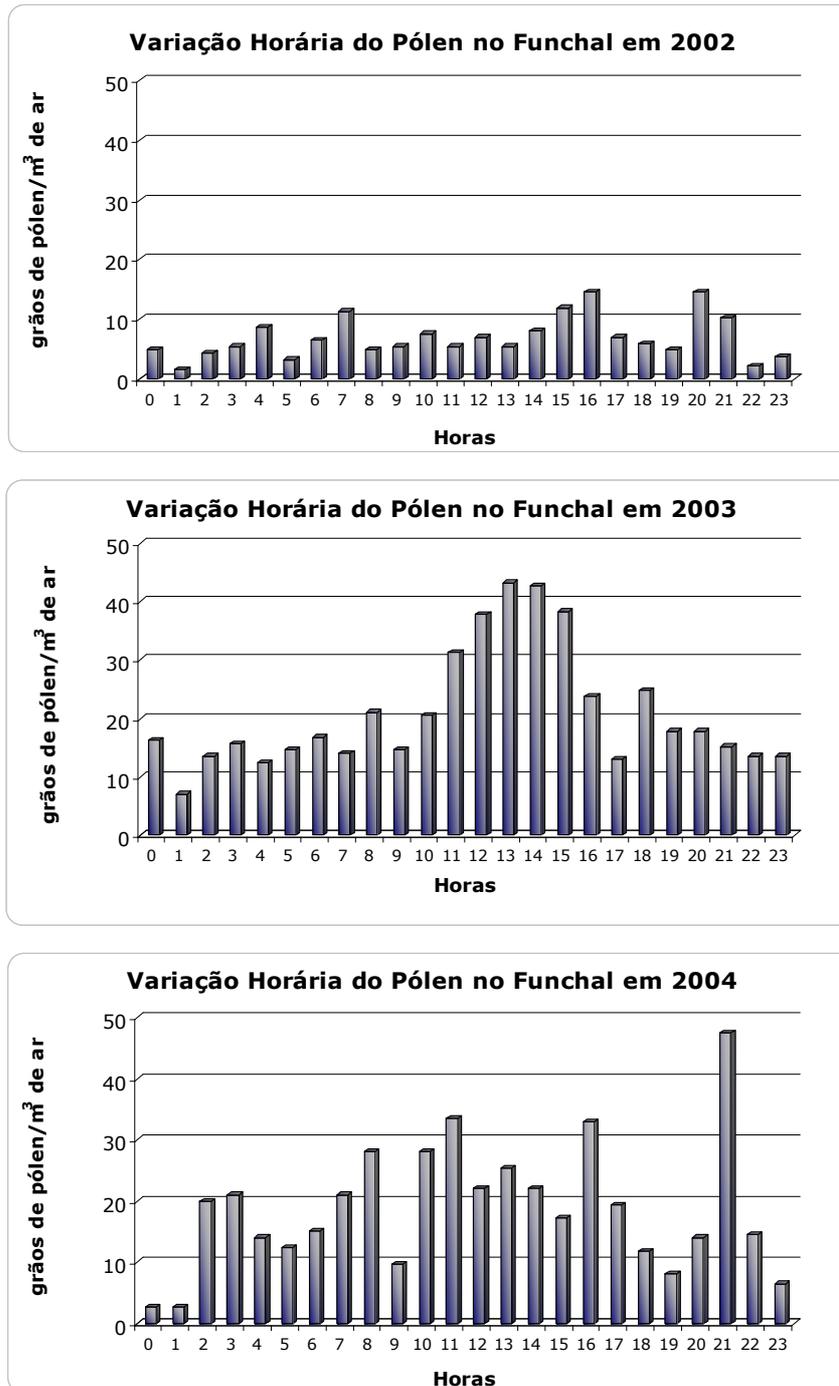


Fig. I 24. Variação intra-diurna do pólen (2002-2004).

Da análise de distribuição efectuada para as variáveis meteorológicas, verifica-se que ocorreu maior número de pólenes quando a humidade relativa variou entre os 50 e 60 %, e a precipitação e velocidade do vento atingiram valores mais baixos. (Fig. I 25).

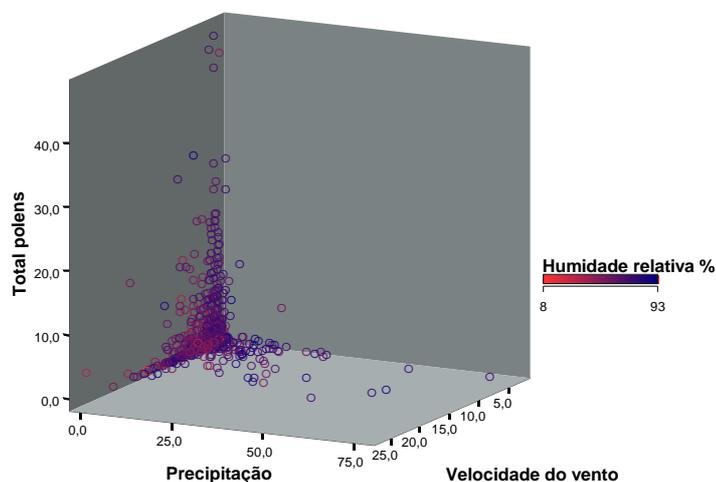


Fig. I 25. Gráfico de dispersão conjunta que relaciona o número total de pólenes, a precipitação, a velocidade do vento e a humidade relativa.

Os coeficientes de correlação de Spearman sugerem que a humidade exerce um efeito positivo no aparecimento de um maior número de pólenes, ao invés da precipitação (Tabela I 6).

Tabela I 6. Correlações de Spearman (r) entre o Número Total de Pólenes e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,018	0,012	0,003	0,064*	-0,137**	0,018

A conversão dos quadrantes do vento em ângulos segundo as correspondências ilustradas na Fig. I 26 permitiu, por um lado, visualizar os quadrantes que foram predominantes, neste caso SW, e por outro lado, interpretar os coeficientes de correlação de Spearman (r) para a ocorrência de pólenes e a direcção do vento.

Sabendo que r varia entre 1 e -1, e considerando os quadrantes como coordenadas cartesianas onde SW corresponde a (-1,-1) e NE às coordenadas (1,1);

Logo:

(i) Para uma correlação significativa de sinal positivo, a ocorrência de pólenes aumentou com o vento a predominar do quadrante Oeste, tendendo para N-NW caso o valor de r seja elevado.

(ii) Para uma correlação significativa de sinal negativo, a ocorrência de pólenes aumentou com o vento a predominar do quadrante Este, tendendo para NE no caso do valor de r fosse mais elevado.

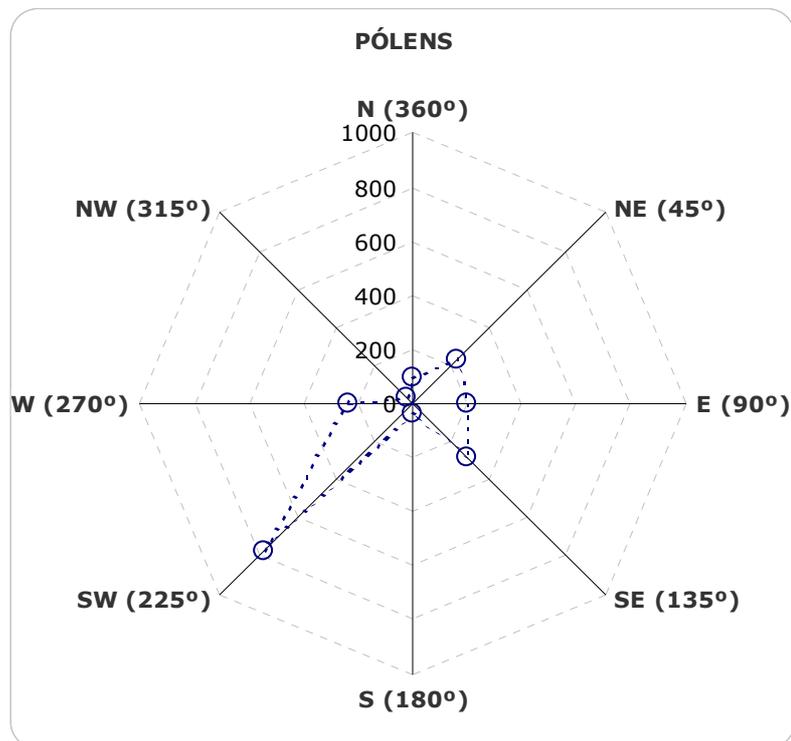


Fig. I 26. Total de pólenes observados segundo os quadrantes da direção do vento.

Tipos Polínicos

Asteraceae

Gênero: *Artemisia*

Nome comum: Losna

Porte: Arbusto

Ecologia e distribuição: Planta comum em locais rochosos do litoral da Madeira. Cultivada ocasionalmente em jardins.

Floração: Abril-Agosto

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, oblado-esferoidal.

Tamanho: 15 a 30 μm de diâmetro.

Aberturas: Tri-zonocolporado.

Ornamentação: Equinado, variando de equinulado, equinado ou fenestrado (característica ao nível da família). Espínulas vestigiais ou microequinado, dispostas irregularmente e sem microperfurações (característica ao nível do género).

Alergenicidade: Elevada. Espécie herbácea que induz com frequência polinose, asma e conjuntivite em indivíduos sensibilizados. Com relevância alérgica no final do Verão.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2002 e 2004 com uma concentração total de 8,1 grãos/m³ de ar. Ao nível da família, a concentração de pólen total foi de 32,33 grãos/m³ de ar para os três anos. As concentrações mais elevadas ocorreram em 2002, contribuindo em cerca de 45% do total referido (Fig. I 27).

Concentrações médias mensais: Em 2002 ocorreu em Outubro e Novembro, com uma média baixa, na ordem de 1 grão/m³, surgiu um pico de ocorrência em Agosto de 2004 com 3,24 grãos/m³ de ar (Fig. I 27).

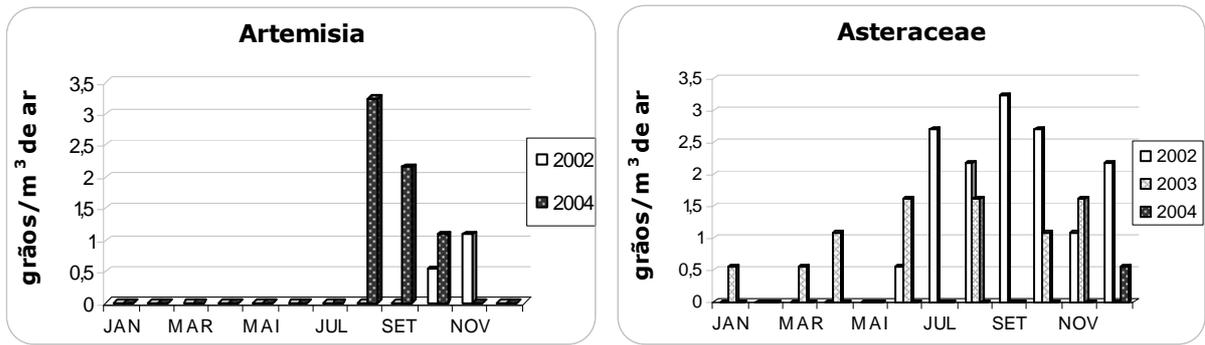


Fig. I 27. Distribuição mensal do pólen de *Artemisia* e de Asteraceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

Concentrações médias horárias: No período de estudo surgiram três picos de ocorrência: às 09h, às 14h e às 21h com uma concentração média de 0,54, 0,9 e 1,62 grãos/m³, respectivamente (Fig. I 28).

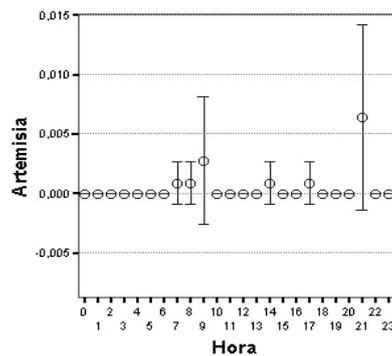


Fig. I 28. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Artemisia* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.)

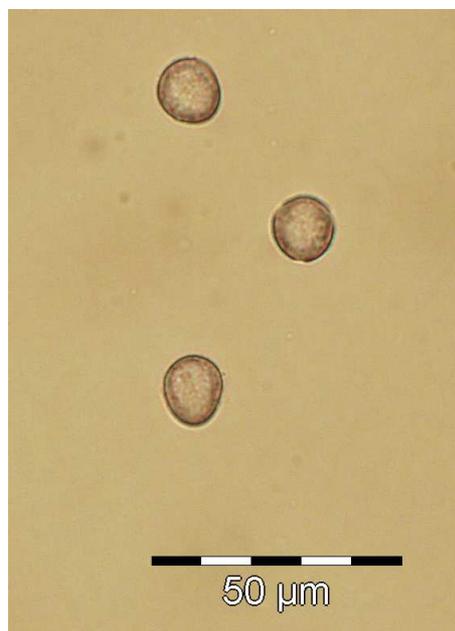
2002	5 de Novembro a 14 de Novembro
2003	-
2004	15 de Agosto a 23 de Outubro

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 7. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Artemisia* e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,182**	0,182**	0,082	0,009	-0,013	0,056

A análise de correlação indica que a incidência de pólen de *Artemisia* é influenciada positivamente pelo aumento da temperatura.

Boraginaceae**Género:** *Echium***Nome comum:** Massaroco**Porte:** Arbusto**Ecologia e distribuição:** Planta comum nas encostas do litoral da Madeira, até os 150 m de altitude na encosta norte, e aos 300 m na encosta sul.**Floração:** Janeiro-Julho**Polinização:** Entomófila**MORFOLOGIA POLÍNICA**

Simetria e Forma: Heteropolar, grão em forma de pêra em visão equatorial.

Tamanho: 17-23 X 11-15 μm .

Aberturas: Tricolporado.

Ornamentação: Exina lisa perfurada

Alergenicidade: Algumas espécies, como *Echium plantagineum*, apresentam potencial alergénico despoletando reacções de hipersensibilidade mediadas pela IgE.**Concentrações totais anuais:** Ocorreu em 2003 e 2004 com uma concentração total de 12,96 grãos/ m^3 de ar. Dado o seu surgimento esporádico, constam somente as datas de ocorrência deste pólen.**Concentrações médias mensais:** Surgiu um pico de ocorrência em Abril de 2003 com 9,18 grãos/ m^3 de ar. Reapareceu em Setembro e Outubro com 1,08 grãos/ m^3 de ar do mesmo ano, e em Janeiro de 2004, com 1,62 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 29).**Concentrações médias horárias:** Ocorreu entre as 6 e as 10 horas, atingindo depois um pico de concentração média de 0,22 grãos/ m^3 de ar às 23 horas (Fig. I 30).

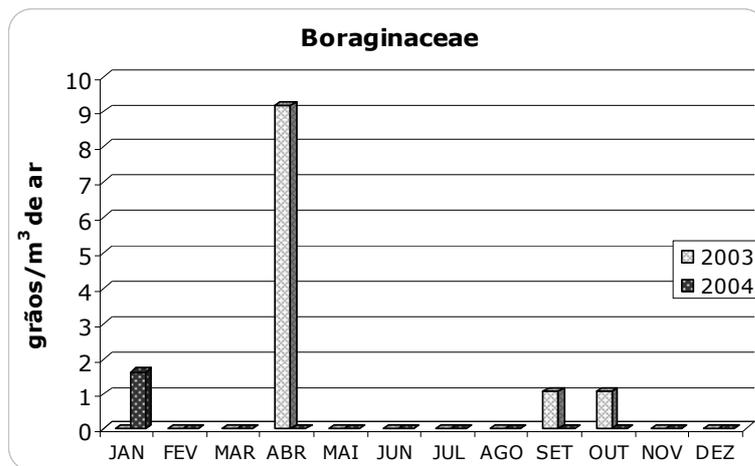


Fig. I 29. Distribuição mensal do pólen de Boraginaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

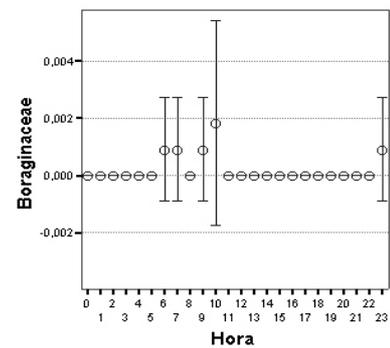


Fig. I 30. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Echium* por hora.

Período de Ocorrência:

ANO

2002

-

2003

1 e 24 de Abril; 2 e 30 de Setembro; 8 e 9 de Outubro

2004

2 e 8 de Janeiro

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 8. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Echium* (Boraginaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,009	0,031	0,001	-0,001	0,004	-0,045

A concentração deste pólen não apresenta correlação com nenhuma das variáveis meteorológicas.

Chenopodiaceae-Amaranthaceae

Gêneros: *Chenopodium*; *Amaranthus*

Nome comum: Fedegoso, formigueira

Porte: Ervas e arbustos

Ecologia e distribuição: Encostas do litoral da Madeira, em áreas cultivadas e não cultivadas.

Floração: Abril-Novembro

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, esferoidal.

Tamanho: 20 a 35 μm .

Aberturas: Polipantoporado, número de poros normalmente superior a 50.

Ornamentação: Psilado-escábrico. Tecto da exina sem perfurações ou com microequínulas. São inexistentes descrições deste tipo polínico para a Ilha da Madeira.

Alergenicidade: É considerado um alergénio importante, desencadeando exacerbações de asma brônquica.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 40,5 grãos/ m^3 de ar. Surgiu com maior expressão em 2003 e 2004 com 17,28 e 17,82 grãos/ m^3 de ar, respectivamente.

Concentrações médias mensais: Observou-se uma ocorrência em Dezembro de 2002 de 5,4 grãos/ m^3 de ar, registando-se os picos de concentração em Maio de 2003 (10,8 grãos/ m^3 de ar) e em Junho de 2004 (7,02 grãos/ m^3 de ar) (Fig. I 31).

Concentrações médias horárias: Ocorreu ao longo de todo o dia, sobretudo entre as 11h e as 16 horas, onde se registou um pico com 5,22 grãos/ m^3 de ar às 15 horas (Fig. I 32).

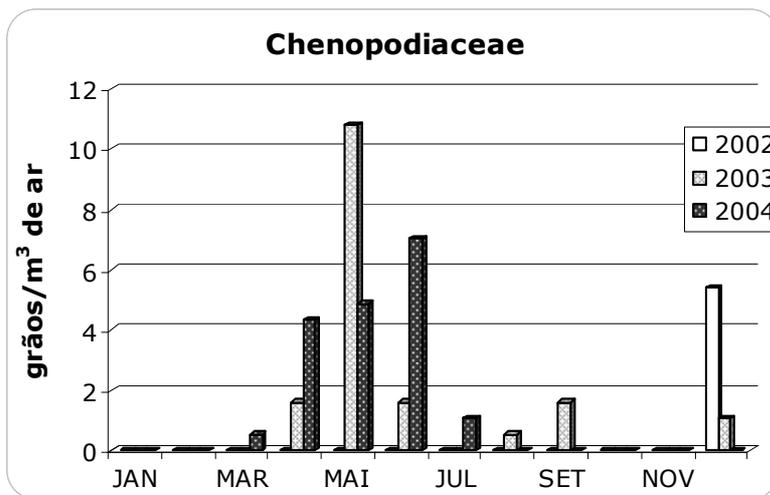


Fig. I 31. Distribuição mensal do pólen de Chenopodiaceae-Amaranthaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

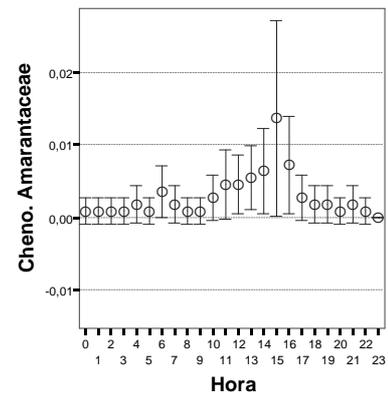


Fig. I 32. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de Chenop.-Amaranthaceae por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2003	27 de Abril a 18 de Dezembro
2004	4 de Abril a 17 de Junho
2002	Período de Ocorrência: 15, 16 e 26 de Dezembro

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 9. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de Chenopodiaceae-Amaranthaceae e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,017	-0,037	-0,014	0,005	-0,016	-0,002

As correlações entre a concentração de pólen de Chenopodiaceae e as variáveis meteorológicas não foram significativas, pelo que não se observa a sua influência clara sobre as concentrações.

Corylaceae

Gêneros: *Corylus*

Porte: Árvore ou arbusto

Ecologia e distribuição: Ocorre em locais frescos e com pouca insolação. Surge em pequenos grupos ou de forma isolada, sendo cultivada pelo fruto.

Floração: Janeiro-Abril

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, sub-obulado.

Tamanho: 18-25 μm de diâmetro.

Aberturas: Tri-zonoporado.

Ornamentação: Psilado-escábrico ou ruguloso. A superfície escultural é bastante rugulosa com microespínulas, ou escábrica nos topos.

Alergenicidade: Árvore produtora de elevadas quantidades de pólen, que induz com frequência polinose, asma e conjuntivite em indivíduos sensibilizados. Alergenicidade baixa a moderada.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 95,58 grãos/ m^3 de ar. Em 2003 registou-se a maior concentração anual com 56,86 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: Os picos de ocorrência surgiram entre os meses de Abril e Junho, atingindo em 2003 um pico em Maio com 43,2 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 33).

Concentrações médias horárias: Ocorreu ao longo de todo o dia, tendo picos de ocorrência entre as 16 e as 21 horas, com uma concentração média horária de 2,1 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 34).

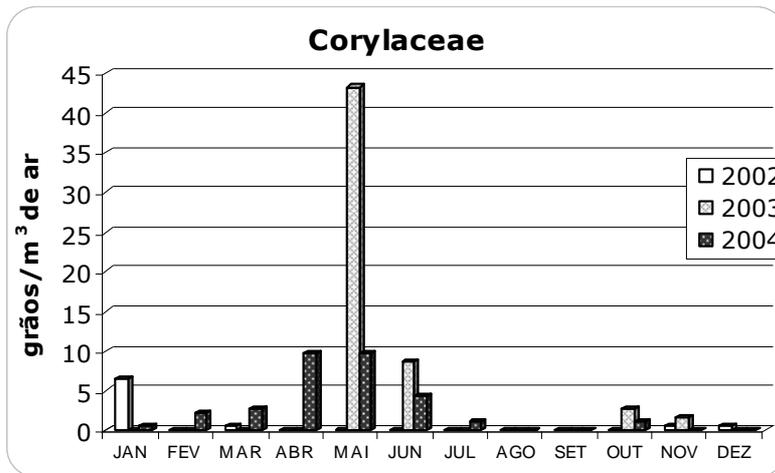


Fig. I 33. Distribuição mensal do pólen de Corylaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

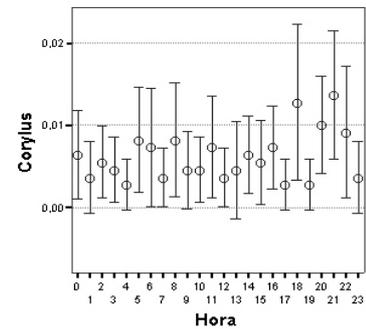


Fig. I 34. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Corylus* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	17 de Dezembro a 14 de Janeiro
2003	3 de Maio a 21 de Outubro
2004	5 de Fevereiro a 1 de Julho

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 10. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Corylus* (Corylaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,038	-0,031	-0,040	0,015	0,032	0,029

Da análise dos coeficientes de correlação, não se verifica a existência de uma correlação entre a concentração deste pólen e as variáveis meteorológicas.

Cupressaceae

Gêneros: *Cupressus*

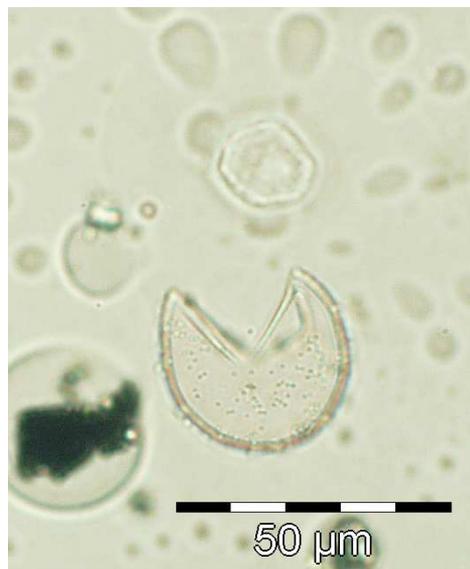
Nome comum: Cipreste

Porte: Árvore

Ecologia e distribuição: Ocorre entre os 600 e os 1000 m de altitude. Surge nalguns jardins públicos do Funchal entre os 175 e os 235 m de altitude.

Floração: Janeiro-Junho; Setembro-Dezembro

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Heteropolar, esferoidal.

Tamanho: 20 a 35 µm de diâmetro.

Aberturas: Inaperturado.

Ornamentação: Psilado

Alergenicidade: Árvore produtora de elevadas quantidades de pólen, que induz com frequência polinose, asma e conjuntivite em indivíduos sensibilizados. Alergenicidade moderada a elevada.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 58,32 grãos/m³ de ar, surgindo em 2004 com 40,5 grãos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: As ocorrências incidiram sobretudo entre Janeiro e Julho, atingindo em 2004 o pico máximo em Abril com 11,88 grãos/m³ de ar (Fig. I 35).

Concentrações médias horárias: Ocorreu ao longo de todo o dia surgindo picos de ocorrência às 7 e às 22 horas com uma concentração média de 1,8 e 1,98 grãos/m³ de ar, respectivamente (Fig. I 36).

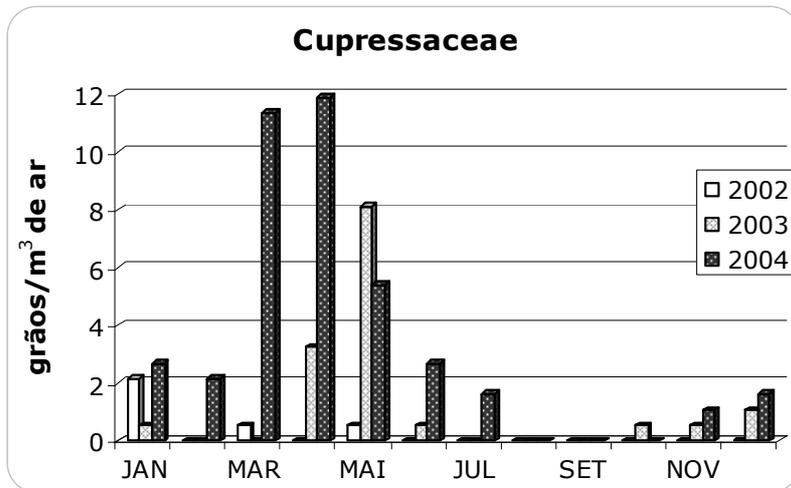


Fig. I 35. Distribuição mensal do pólen de Cupressaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

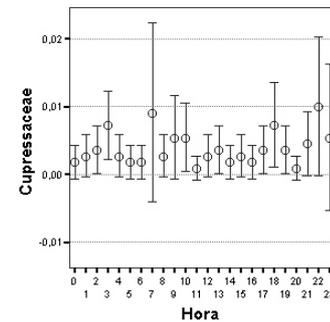


Fig. I 36. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Cupressus* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	16 de Janeiro a 21 de Março
2003	24 de Abril a 18 de Novembro
2004	7 de Janeiro a 2 de Junho

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 11. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Cupressus* (Cupressaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,106**	-0,116**	-0,107**	-0,031	-0,017	-0,002

A análise de correlação sugere a influência negativa da temperatura na concentração de pólen de *Cupressus*.

Ericaceae

Gêneros: *Erica*

Nome comum: Urze

Porte: Árvores e arbustos

Ecologia e distribuição: Planta comum que vive desde o litoral da Madeira até os 1400 m de altitude.

Floração: Abril-Setembro

Polinização: Entomófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Heteropolar, tétradas tetraédricas, por vezes irregulares.

Tamanho: 33-49 μm .

Aberturas: Ectoabertura tipo colpo, largos e estreitos. Endoabertura tipo poro, elíptico.

Ornamentação: Ruguloso.

Alergenicidade: É considerado um alérgeno importante, desencadeando exacerbações de asma brônquica.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 66,96 grãos/ m^3 de ar. Em 2004 registou-se a maior concentração anual com um total de 41,04 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: Os picos de ocorrência surgiram com maior expressão em Maio de 2003 e 2004 com uma média de 21 grãos/ m^3 de ar, reaparecendo nos meses de Dezembro e Janeiro com concentrações médias de 0,8 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 37).

Concentrações médias horárias: Ocorreu ao longo de todo o dia, à excepção de algumas horas da manhã, surgindo dois picos de ocorrência às 8 e às 21 horas com uma concentração média de 2,34 e 2,55 grãos/ m^3 de ar, respectivamente (Fig. I 38).

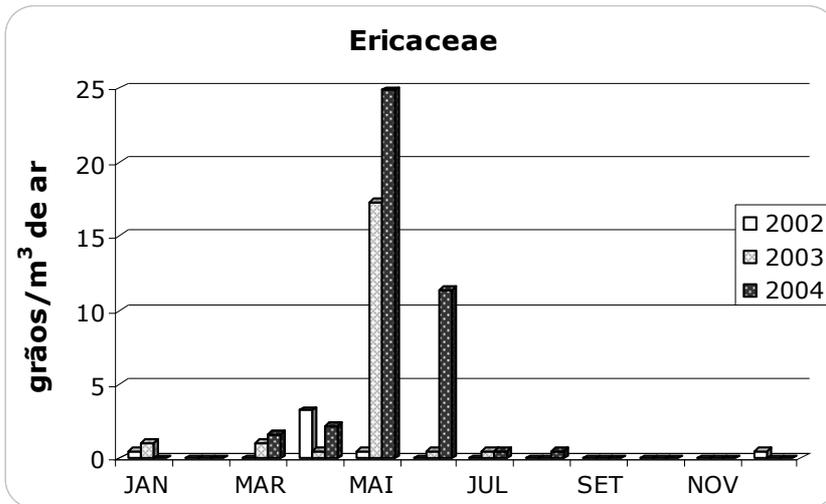


Fig. I 37. Distribuição mensal do pólen de Ericaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

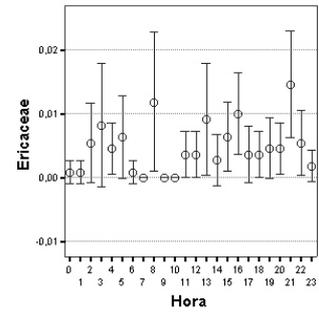


Fig. I 38. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Erica* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	25 de Abril a 22 de Maio
2003	1 de Março a 25 de Maio
2004	10 de Abril a 26 de Junho

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 12. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Erica* (Ericaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,021	-0,029	-0,044	0,050	-0,074*	-0,007

A análise de correlação sugere a influência negativa da precipitação na concentração de pólen de *Erica*.

Euphorbiaceae

Gêneros: *Euphorbia* sp.

Nome comum: Trovisco, eufórbia

Porte: Ervas e arbustos

Ecologia e distribuição: Comum no litoral da Madeira e em áreas não cultivadas, ocorrendo sobretudo entre os 400 e os 1000 m de altitude. Comum em ruas e praças do Funchal

Floração: Apresenta espécies cuja floração ocorre ao longo de todo o ano, embora a maioria polinize de Outubro a Maio.

Polinização: Entomófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, esferoidal-elíptico.

Tamanho: Pequeno-médio (22-30 x 19-27 μm de diâmetro).

Aberturas: Trizonoporado.

Ornamentação: Psilado, escábrico, podendo ser reticulado.

Alergenicidade: Foram descritos casos de sensibilização a *Euphorbia fulgens* e a espécies com importância económica e medicinal, como *Ricinus communis*, e pertencentes aos géneros *Mercurialis* e *Hevea*.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 14,04 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: Surgiu em Abril de 2003 tendo um pico de ocorrência em Maio com 13,5 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 39). Dado a sua ocorrência esporádica, são apresentadas somente as datas da observação pontual deste tipo polínico.

Concentrações médias horárias: Ocorreu sobretudo entre as 12 e as 17 horas, surgindo um pico de ocorrência às 14 horas, com uma concentração média de 4,32 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 40).

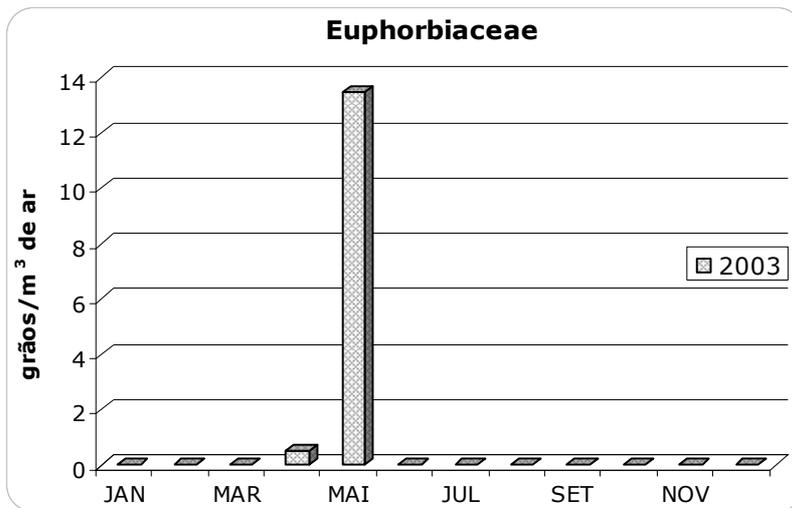


Fig. I 39. Distribuição mensal do pólen de Euphorbiaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

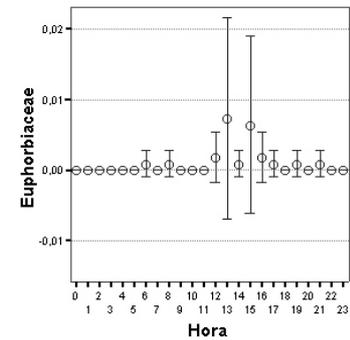


Fig. I 40. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Euphorbia* por hora.

Período de Ocorrência:

ANO	
2002	-
2003	22 e 26 de Maio
2004	-

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 13. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Euphorbia* (Euphorbiaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,019	0,024	0,018	-0,037	-0,031	-0,011

Da análise dos coeficientes de correlação, não se verifica a existência de uma correlação entre a concentração de pólen de *Euphorbia* e as variáveis meteorológicas.

Fabaceae

Gêneros: *Acacia*

Nome comum: Acácia

Porte: Árvore

Ecologia e distribuição: Planta originária da Austrália, ocorre geralmente a altitudes superiores a 100 m do nível do mar. Surge em alguns jardins públicos do Funchal entre os 175 e os 235 m.

Floração: Janeiro-Abril; Outubro-Dezembro

Polinização: Entomófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Tétradas, políadas regulares de 8, 16 ou 32 grãos.

Tamanho: 20-70 μm .

Aberturas: Aberturas das células individuais obscura a colporada.

Ornamentação: Psilado a microreticulado.

Alergenicidade: É considerado um alérgeno importante, desencadeando exacerbações de asma brônquica.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 10,8 grãos/ m^3 de ar/ano, ocorrendo somente em 2004, com 7,02 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: As ocorrências incidem sobretudo entre Janeiro e Julho atingindo os picos máximos de concentração entre Março e Maio com 2,16 grãos/ m^3 de ar, reaparecendo em Dezembro com 0,54 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 41).

Concentrações médias horárias: No período de estudo surgiram dois picos de ocorrência: um às 11 e outro às 21 horas com uma concentração média de 0,81 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 42).

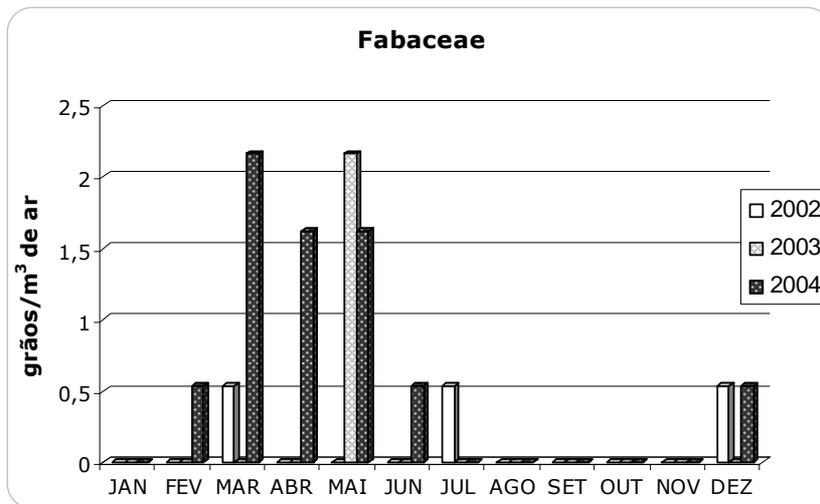


Fig. I 41. Distribuição mensal do pólen de Fabaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

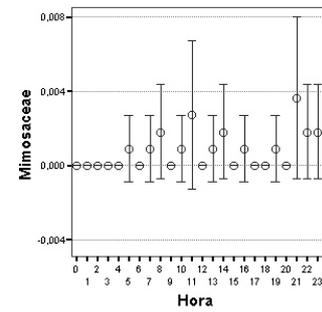


Fig. I 42. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Acacia* por hora.

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 15. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Acacia* (Fabaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,027	-0,015	-0,041	-0,056	-0,034	0,016

Da análise dos coeficientes de correlação, não se verifica a existência de uma correlação entre a concentração de pólen de *Acacia* e as variáveis meteorológicas.

***Robinia pseudacacia* L.**

Nome comum: Falsa acácia

Porte: Árvore

Ecologia e distribuição: Comum em jardins e parques como planta ornamental

Floração: Maio a Julho

Polinização: Entomófila

**MORFOLOGIA POLÍNICA**

Simetria e Forma: Isopolar, radial. Rotacional elipsóide.

Tamanho: 28-34 X 27-31 μm .

Aberturas: Tri-zonocolporado. Ectoabertura tipo colpo. Endoabertura tipo poro.

Ornamentação: Perfurado.

Alergenicidade: É considerado um alérgeno importante, desencadeando exacerbações de asma brônquica.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2003 e 2004 com a concentração total de 36,18 grãos/ m^3 de ar e de 18 grãos/ m^3 de ar de média anual.

Concentrações médias mensais: Ocorreu entre Maio e Setembro de 2003 com um pico de 5,94 grãos/ m^3 de ar em Agosto, e um pico de 8,64 grãos/ m^3 de ar em Junho 2004 (Fig. I 43).

Concentrações médias horárias: A ocorrência incidu sobretudo entre as 9 e 16 horas, surgindo um pico de concentração média de 6,48 grãos/ m^3 de ar às 10 horas (Fig. I 44).

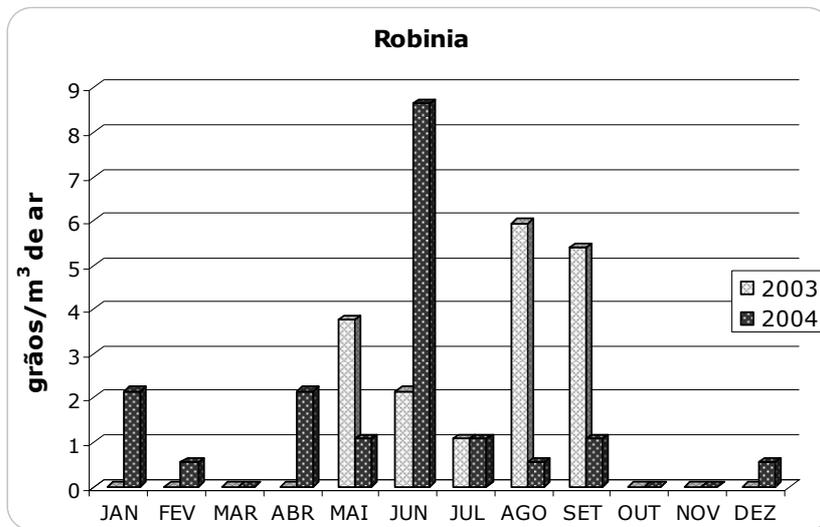


Fig. I 43. Distribuição mensal do pólen de *Robinia* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

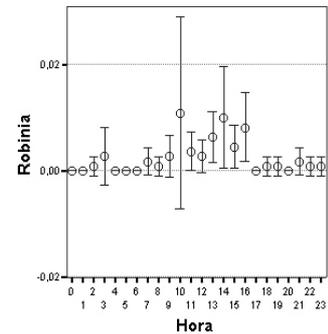


Fig. I 44. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Robinia* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	-
2003	16 de Maio a 8 de Setembro
2004	2 de Janeiro a 13 de Setembro

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 16. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Robinia* e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (C°)	Temperatura Máxima (C°)	Temperatura Mínima (C°)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,202**	0,185**	0,190**	0,036	-0,193**	-0,011

A análise de correlação sugere a influência positiva da temperatura na concentração deste pólen, e negativa, da precipitação.

Ginkgoaceae

Géneros: *Ginkgo*

Porte: Árvore

Ecologia e distribuição: Cultivada em parques e jardins em todos os climas temperados. Ocorre em alguns jardins públicos do Funchal.

Floração: Março-Maio

Polinização: Entomófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, esferoidal.

Tamanho: 27-32 μm de diâmetro.

Aberturas: Monocolpado.

Ornamentação: Microreticulada.

Alergenicidade: O pólen de *Ginkgo biloba* poderá causar sintomas de alergia respiratória, embora não haja evidências da presença de alérgenos em extractos de *Ginkgo* que provoquem reacções de hipersensibilidade do tipo I. A proporção da reactividade em testes em *Prick* a este pólen é cerca de 4,7% numa população de indivíduos coreanos com alergia respiratória.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 9,72 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: Registaram-se ocorrências entre Abril e Maio, surgindo um pico máximo em Abril de 2003 de 6,48 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 45). Dado a sua ocorrência esporádica, definiu-se somente as datas em foi observado este tipo polínico.

Concentrações médias horárias: Ocorreu durante a madrugada, manhã e fim de tarde, atingindo um pico às 22 horas, com uma concentração média de 0,9 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 46).

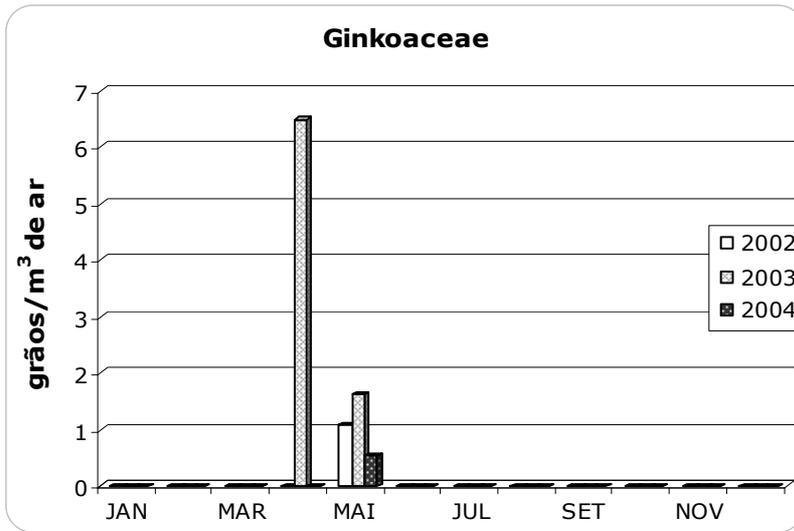


Fig. I 45. Distribuição mensal do pólen de Ginkgoaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

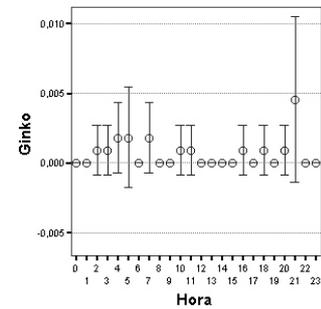


Fig. I 46. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Ginkgo* por hora.

Período de Ocorrência:

ANO	Período
2002	5 de Maio
2003	26 de Abril a 4 de Maio
2004	14 de Maio

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 14. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Ginkgo* (Ginkgoaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,038	-0,162*	-0,033	0,032	-0,016	0,033

A análise de correlação sugere a influência negativa da temperatura máxima na concentração deste pólen.

Myrtaceae

Gêneros: *Callistemon* (martinete) (foto ao M.O.);
Eucalyptus

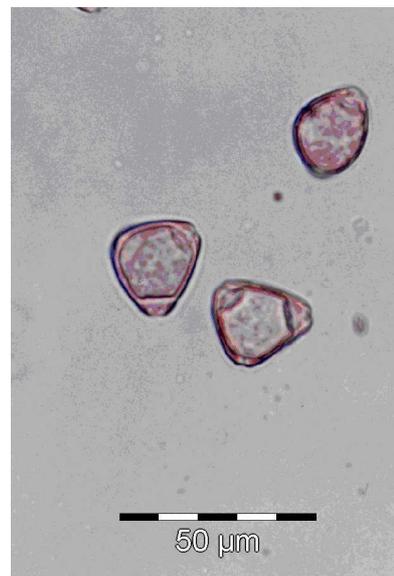
Porte: Arbusto e Árvore

Ecologia e distribuição: *Callistemon* é originária da Austrália. Ocorre entre os 0 e os 450 m de altitude, sendo comum em jardins públicos e privados do Funchal.

Eucalyptus é comum em parques e jardins da Madeira. Ocorre acima dos 1250 m.

Floração: *Callistemon*: Fevereiro; Abril-Junho

Polinização: Entomófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, radial.

Tamanho: 20-25 μm .

Aberturas: Tri-zonocolporado.

Ornamentação: Exina lisa, escábrica, rugulosa ou verrugosa. São inexistentes descrições deste tipo polínico para a Ilha da Madeira.

Alergenicidade: Os alergénios destas plantas ainda não foram caracterizados.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 89,64 grãos/ m^3 de ar. Em 2003 registou-se a concentração anual mais elevada, com 46,44 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: As ocorrências incidiram sobretudo entre Janeiro e Julho, atingindo-se em Maio de 2003 um dos picos máximos de concentração de 29,16 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 47).

Concentrações médias horárias: No período em estudo surgiu ao longo de todo o dia, ocorrendo dois picos de concentração entre as 11 e as 13 horas, com uma concentração média de 5 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 48).

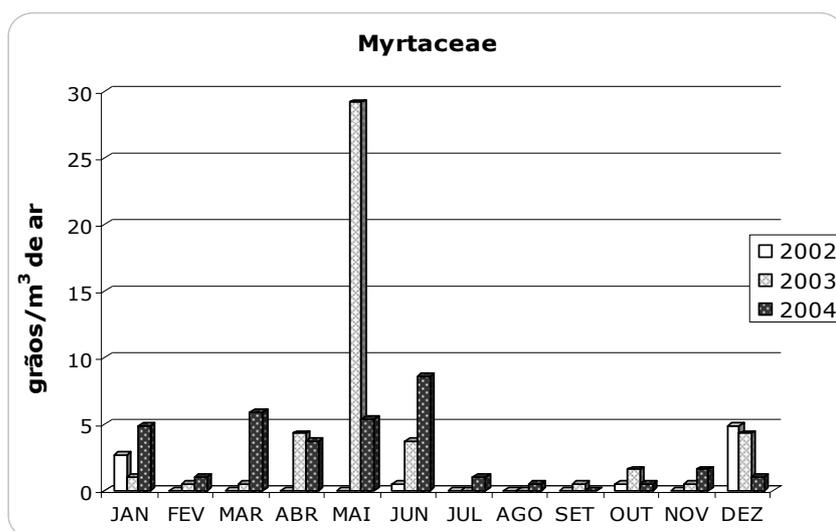


Fig. I 47. Distribuição mensal do pólen de Myrtaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

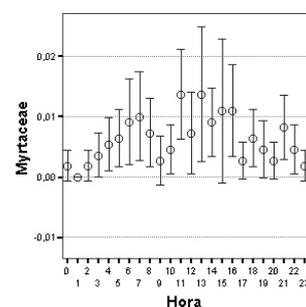


Fig. I 48. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de Myrtaceae por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	
2002	15 de Dezembro a 14 de Janeiro
2003	11 de Novembro a 6 de Junho
2004	28 de Novembro a 18 de Julho

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 17. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de Myrtaceae e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (C°)	Temperatura Máxima (C°)	Temperatura Mínima (C°)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,026	-0,037	-0,018	0,043	0,070	0,026

Da análise dos coeficientes de correlação, não se verifica a existência de uma correlação entre a concentração de pólen de Myrtaceae e as variáveis meteorológicas.

Myricaceae

Gêneros: *Myrica*

Nome comum: Faia

Porte: Arbusto ou pequena árvore.

Ecologia e distribuição: Abundante na Laurissilva na Madeira. Ocorre desde os 0 aos 1000 m de altitude.

Surge em jardins públicos acima dos 500 m de altitude.

Floração: Março-Maio

Polinização: Anemófila

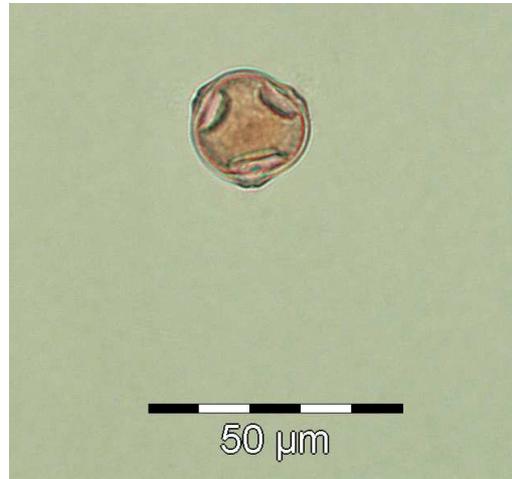
MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, rotacional elipsóide.

Tamanho: 19-24 X 24-30 μm .

Aberturas: Trizonoporado. Poros no plano equatorial, de forma cónica, cujas paredes no seu interior possuem elementos irregulares.

Ornamentação: Psilado-escábrico, ruguloso, microequinado, microespinulado ou escábrico.



Alergenicidade: Embora o tipo de polinização seja anemófila, a sua presença escassa na atmosfera não a tornam responsável por problemas de alergia. Foram documentados casos pontuais de sensibilização ao pólen de *Myrica cerifera*.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2003 e 2004, com uma concentração total de 14,58 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: Registaram-se ocorrências entre Abril e Julho observando-se um pico de concentração de 7,56 grãos/ m^3 em Maio de 2003 (Fig. I 49).

Concentrações médias horárias: Ocorreu de forma intermitente ao longo do dia, surgindo dois picos de ocorrência: um de madrugada (03h) e outro à tarde (15h), com uma concentração média de 2,16 e 1,62 grãos/ m^3 de ar, respectivamente (Fig. I 50).

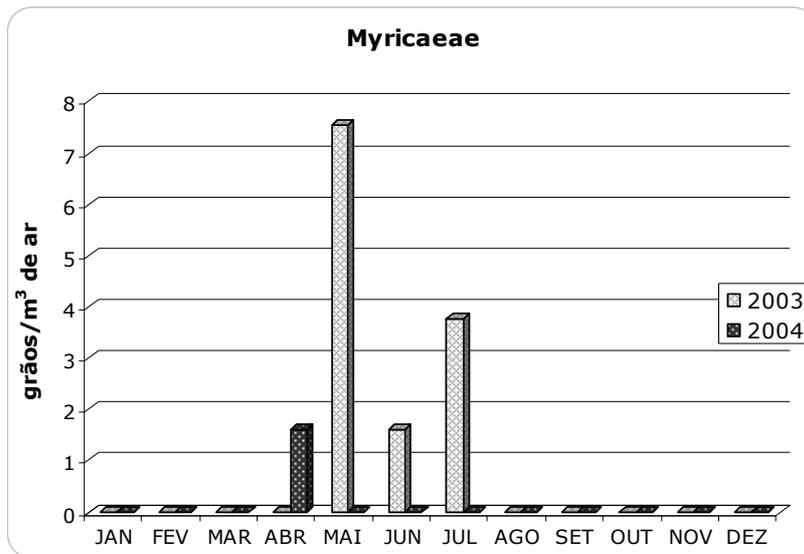


Fig. I 49. Distribuição mensal do pólen de Myricaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

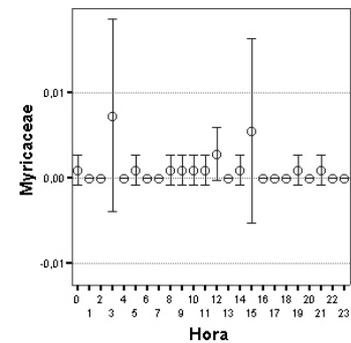


Fig. I 50. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Myrica* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	
2002	-
2003	4 de Maio a 20 de Julho

Período de Ocorrência:

2004	5 e 15 de Abril
------	-----------------

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 18. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Myrica* (Myricaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,007	0,004	-0,019	-0,014	-0,057	-0,035

Da análise dos coeficientes de correlação, não se verifica a existência de uma correlação entre a concentração de pólen de *Myrica* e as variáveis meteorológicas.

Nyctaginaceae

Bougainvillea glabra

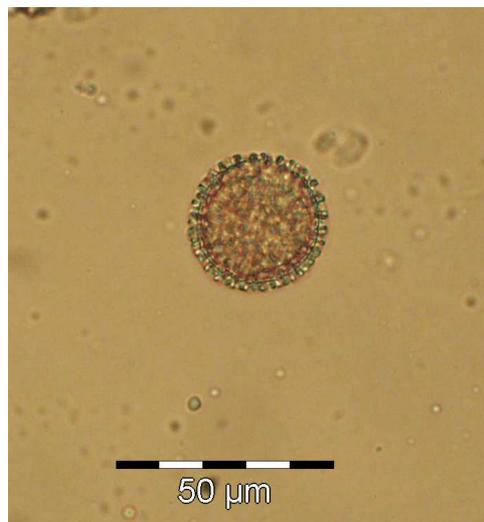
Nome comum: Buganvílea

Porte: Trepadeira

Ecologia e distribuição: Originária do Brasil, ocorre dos 0 aos 450 m de altitude. Comum em taludes e arribas do litoral do Funchal, bem como sobre as ribeiras que atravessam o centro da cidade.

Floração: Todo o ano.

Polinização: Entomófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, rotacional elipsóide.

Tamanho: 19-24 X 24-30 µm.

Aberturas: Tricolpado.

Ornamentação: Reticulado.

Alergenicidade: A espécie não é considerada alergénica, sendo mesmo recomendada na elaboração de jardins, pelo seu carácter hipoalergénico e valor ornamental.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2002 e 2003, com uma concentração total de 7,56 grãos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: Registaram-se ocorrências de 1,08 grãos/m³ de ar em Dezembro de 2002 e Junho de 2003, ocorrendo o pico máximo em Maio de 2003 com 5,4 grãos/m³ de ar (Fig. I 51).

Concentrações médias horárias: Apresentou uma ocorrência intermitente ao longo do dia surgindo um pico de ocorrência às 15 horas com uma concentração média de 2,16 grãos/m³ de ar (Fig. I 52).

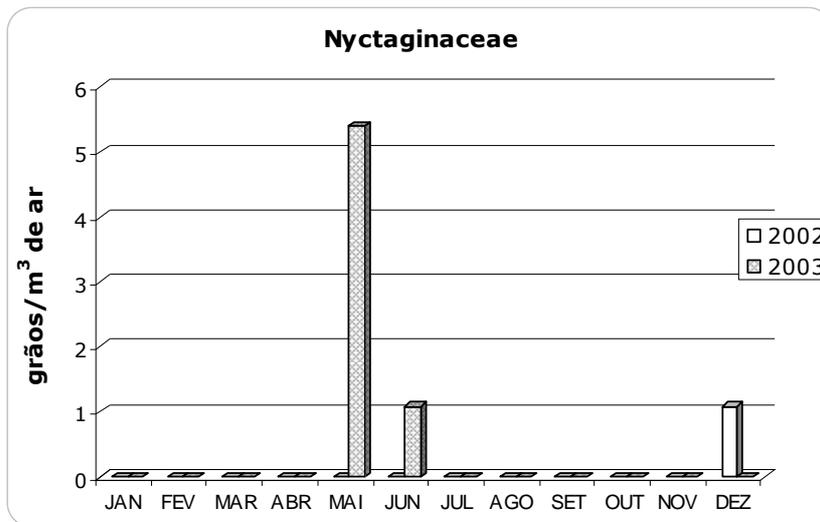


Fig. I 51. Distribuição mensal do pólen de Nyctaginaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

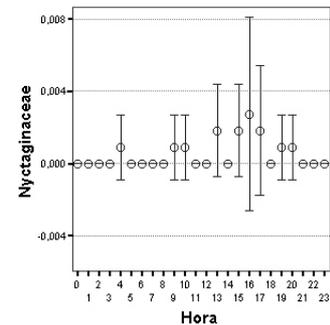


Fig. I 52. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *B. glabra* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO

2003 30 de Maio a 19 de Junho

2004 -

Período de Ocorrência:

2002 12 e 15 de Dezembro

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 19. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *B. glabra* (Nyctaginaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,010	-0,016	0,021	0,056	0,027	-0,007

Da análise dos coeficientes de correlação, não se verifica a existência de uma correlação entre a concentração de pólen e as variáveis meteorológicas.

Pinaceae

Gêneros: *Pinus*

Nome comum: Pinheiro

Porte: Árvore

Ecologia e distribuição:

Surge nalguns jardins públicos do Funchal e em zonas extensas da Madeira desde os 0 e aos 1500 m.

Floração: Março-Abril; Agosto-Outubro

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Heteropolar, sacado.

Tamanho: 30-62 X 44-70 μm ou 40 a 100 μm de diâmetro.

Aberturas: Inaperturado.

Ornamentação: Ruguloso. São inexistentes descrições deste tipo polínico para a Ilha da Madeira.

Alergenicidade: Árvore produtora de elevadas quantidades de pólen, que induz com frequência polinose, asma e conjuntivite em indivíduos sensibilizados, embora o seu poder alergológico seja considerado baixo.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com concentração total de 69,12 grãos/m³ de ar de onde 48,06 grãos/m³ foram registados em 2004.

Concentrações médias mensais: Ocorreu sobretudo entre Janeiro e Junho, atingindo o pico máximo com 27,54 grãos/m³ de ar em Fevereiro de 2004 (Fig. I 53).

Concentrações médias horárias: Ocorreu ao longo de todo o dia, surgindo dois picos de ocorrência, às 17 e 21h, com uma concentração média de 2,25 grãos/m³ de ar (Fig. I 54).

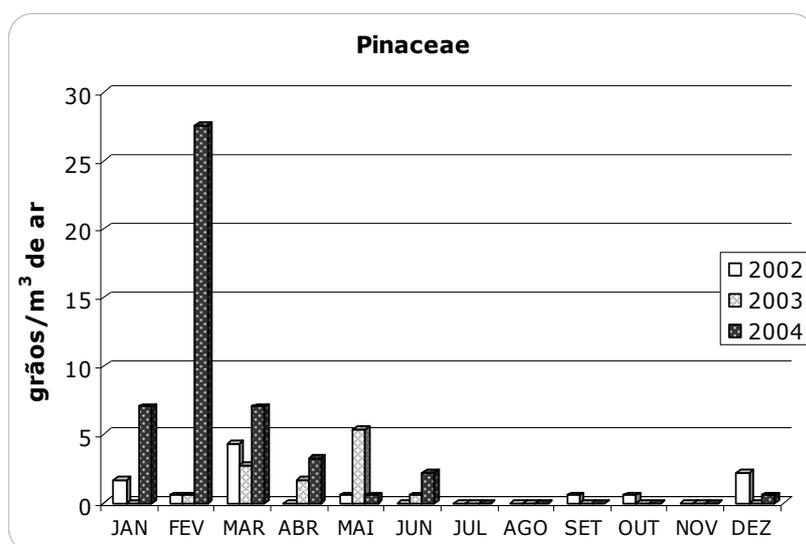


Fig. I 53. Distribuição mensal do pólen de Pinaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

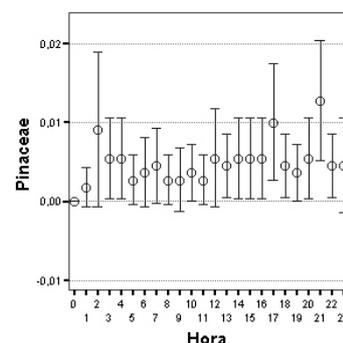


Fig. I 54. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Pinus* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	20 de Outubro a 26 de Março
2003	2 de Março a 31 de Maio
2004	29 de Janeiro a 30 de Junho

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 20. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Pinus* (Pinaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,496*	-0,382*	-0,333*	-0,152	-0,125	0,002

A análise de correlação sugere a influência negativa da temperatura na concentração deste pólen.

Plantaginaceae**Gêneros:** *Plantago***Nome comum:** Tanchagem**Porte:** Herbácea**Ecologia e distribuição:** Comum em áreas não cultivadas e em encostas expostas ao sol.**Floração:** Abril-Outubro**Polinização:** Anemófila**MORFOLOGIA POLÍNICA**

Simetria e Forma: Isopolar, esferoidal.

Tamanho: 26 a 34 μm de diâmetro ou 15-25 μm .

Aberturas: Polipantoporado, entre 5 a 15 poros.

Ornamentação: Microequinado, escábrico ou verrucoso. São inexistentes descrições deste tipo polínico para a Ilha da Madeira.

Alergenicidade: Espécie herbácea que induz com frequência polinose, asma e conjuntivite em indivíduos sensibilizados. Alergenicidade moderada.**Concentrações totais anuais:** Ocorreu com uma concentração total de 13,5 grãos/ m^3 de ar de onde 6,48 foram registados em 2004.**Concentrações médias mensais:** Ocorreu essencialmente entre Abril e Julho, atingindo em Maio de 2003 e de 2004 um pico máximo com 2,7 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 55).**Concentrações médias horárias:** Ocorreu de forma intermitente ao longo do dia, surgindo um pico de ocorrência às 16 horas, com uma concentração média de 1,44 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 56).

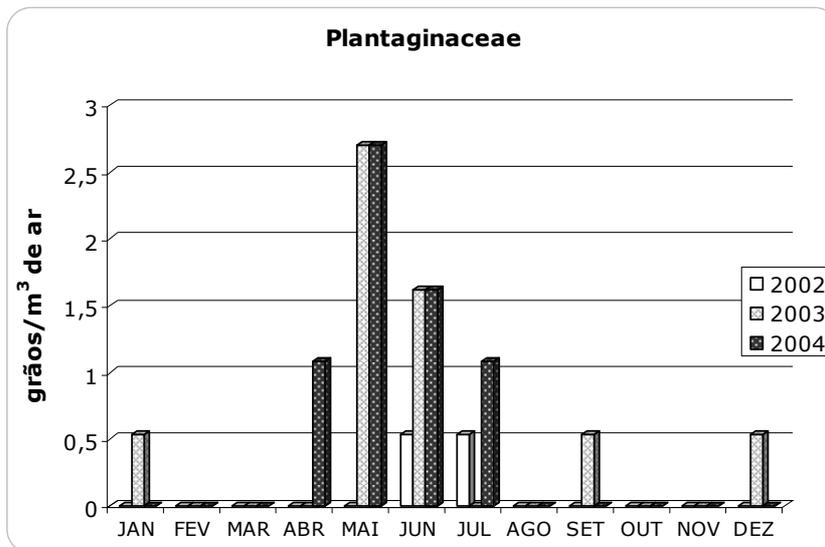


Fig. I 55. Distribuição mensal do pólen de Plantaginaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

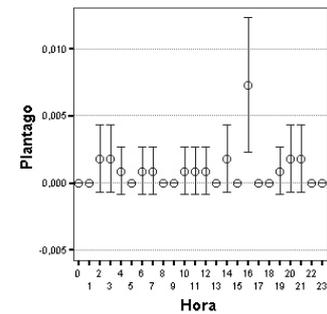


Fig. I 56. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Plantago* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2003	12 de Maio a 16 de Junho
2004	20 de Abril a 2 de Julho

Período de Ocorrência:

2002	17 de Junho e 16 de Julho
------	---------------------------

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 21. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Plantago* (Plantaginaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,039	0,038	0,026	0,069*	-0,176*	0,001

A análise de correlação sugere a influência negativa da precipitação na concentração deste pólen.

Platanaceae

Gêneros: *Platanus*

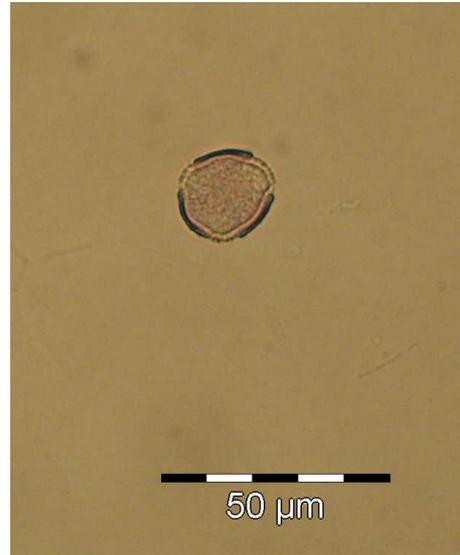
Nome comum: Plátano

Porte: Árvore

Ecologia e distribuição: Encontrado preferencialmente em jardins e parques citadinos. Surge no centro e periferia da cidade do Funchal, e acima dos 500 m de altitude no Parque Municipal do Monte.

Floração: Abril-Maio

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, Sub-oblado. Grãos elípticos a circulares em visão equatorial.

Tamanho: 16 a 20 μm de diâmetro.

Aberturas: Tri-zonocolpado.

Ornamentação: Microreticulado. São inexistentes descrições deste tipo polínico para a Ilha da Madeira.

Alergenicidade: Árvore produtora de elevadas quantidades de pólen, que induz com frequência polinose, asma e conjuntivite em indivíduos sensibilizados.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2003 e 2004 com uma concentração total de 7,56 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: Ocorreu entre Abril e Maio, surgindo um pico máximo em Maio de 2004 de 6,48 grãos/ m^3 (Fig. I 57).

Concentrações médias horárias: Ocorreu entre as 12 e as 18 horas, surgindo um pico de ocorrência às 15 horas, com uma concentração média de 1,62 grãos/ m^3 de ar (Fig. 58).

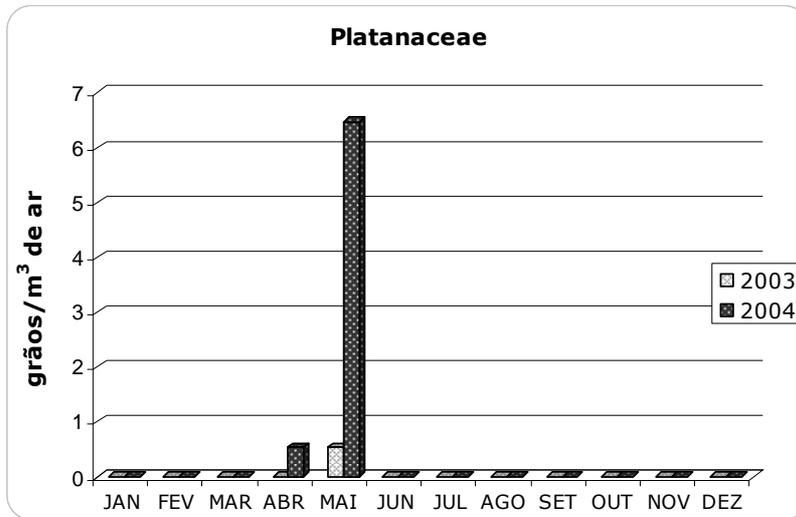


Fig. I 57. Distribuição mensal do pólen de Platanaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

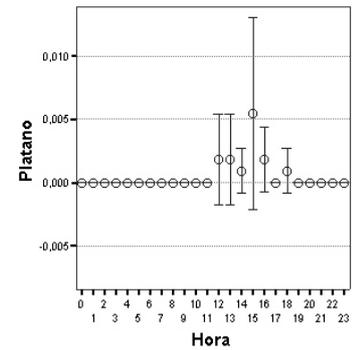


Fig. I 58. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Platanus* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	-
2004	De 6 a 22 de Maio

Período de Ocorrência:

2003	24 de Maio
------	------------

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 22. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Platanus* (Platanaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	-0,095	-0,096	-0,078	0,001	0,047	-0,292*

A análise de correlação sugere a influência negativa do vento direccionado do quadrante Este-Sudeste na concentração deste pólen.

Poaceae

Nome comum: Erva, grama

Porte: Herbácea

Ecologia e distribuição: Cosmopolita, comum nos mais variados tipos de habitats, em zonas rurais, no litoral madeirense, ocorrendo desde o nível do mar até os 1800 m de altitude.

Floração: Abril-Setembro. Todo o ano.

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Heteropolar, esferoidal.

Tamanho: 15 a 60 μm e de 50 a 110 μm de diâmetro.

Aberturas: Monoporado. Poros bem definidos e circulares.

Ornamentação: Grãos tectados, verrugosos, microverrugosos, rugulosos, escábricos ou psilados. São inexistentes descrições deste tipo polínico para a Ilha da Madeira.

Alergenicidade: É considerado um alergénio importante, desencadeando exacerbações de asma brônquica. Com relevância alérgica no início do Verão. Alergenicidade moderada a elevada.

Concentrações totais anuais: Ocorrência perianual com uma concentração total de 154,98 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: Com ocorrência sobretudo entre Abril e Julho atingindo em Julho de 2002 o pico máximo com 24,84 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 59).

Concentrações médias horárias: Ocorreu ao longo de todo o dia, surgindo um pico de ocorrência às 20 horas, com uma concentração média de 6,48 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 60).

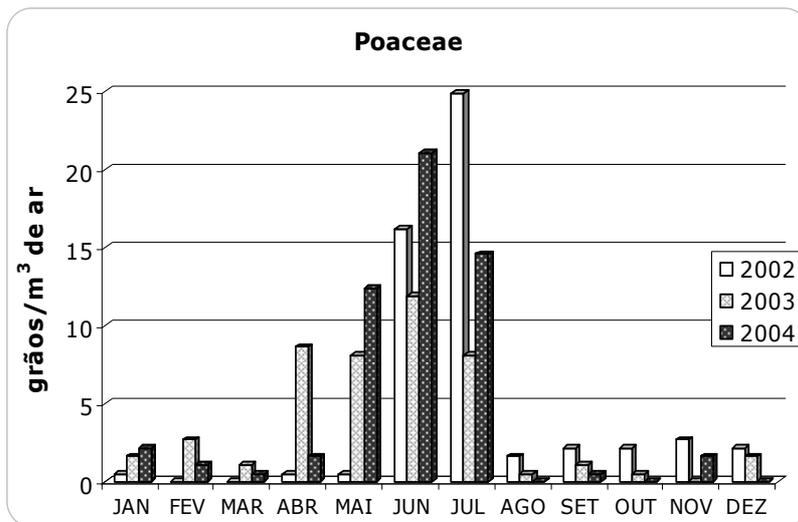


Fig. I 59. Distribuição mensal do pólen de Poaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

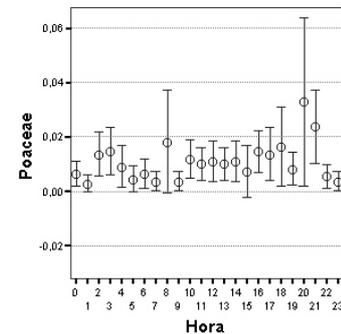


Fig. I 60. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de Poaceae por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	24 de Maio a 29 de Novembro
2003	20 de Fevereiro a 2 de Outubro
2004	10 de Janeiro a 5 de Julho

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 23. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de Poaceae e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,130	0,116	0,131	0,096	-0,277*	0,051

A análise de correlação sugere a influência negativa da precipitação na concentração deste pólen.

Polygonaceae

Gêneros: *Rumex*

Nome comum: Azedas

Porte: Herbáceo

Ecologia e distribuição: Comum em áreas cultivadas e não cultivadas, bem como no litoral da Madeira.

Floração: Abril-Julho

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, esferoidal (prolado-esferoidal a oblado-esferoidal).

Tamanho: 20 a 30 μm de diâmetro.

Aberturas Tri- ou tetrazonocolporado.

Ornamentação: Perforado, ruguloso, escábrico, microreticulado ou reticulado.

Alergenicidade: Espécie que induz com frequência polinose, asma e conjuntivite em indivíduos sensibilizados, embora a sua concentração no ar não seja habitualmente muito elevada. Alergenicidade baixa.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2002 e 2003 com uma concentração total de 11,34 grãos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: As ocorrências incidiram sobretudo entre Abril e Julho, atingindo em Maio de 2004 o pico máximo de 3,78 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 61).

Concentrações médias horárias: Ocorreu de forma intermitente ao longo do dia surgindo dois picos de ocorrência entre as 9 e as 11 horas, com uma concentração média de 1,08 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 62).

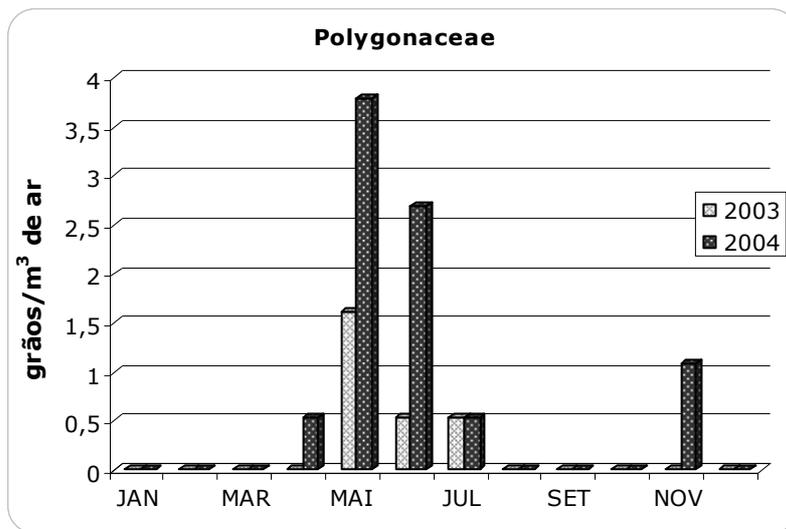


Fig. I 61. Distribuição mensal do pólen de *Rumex* (Polygonaceae) na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

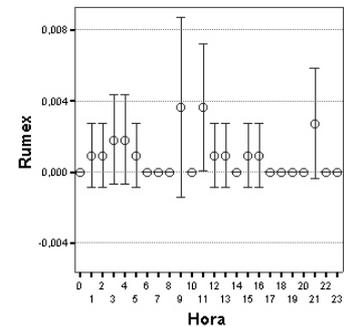


Fig. I 62. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Rumex* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	-
2003	22 de Maio a 6 de Junho
2004	13 de Maio a 16 de Junho

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 24. Coeficientes de correlações de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Rumex* e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,030	0,016	0,037	0,027	-0,033	0,007

Da análise dos coeficientes de correlação, não se verifica a existência de uma correlação entre a concentração de pólen de *Rumex* e as variáveis meteorológicas.

Solanaceae

Gêneros: *Datura*

Nome comum: Trombeteira

Porte: Ervas e arbustos

Ecologia e distribuição: Comum em áreas cultivadas e não cultivadas. Ocorre desde os 0 aos 550 m.

Floração: Abril a Dezembro

Polinização: Entomófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, radial.

Tamanho: 30-45 X 39-40 μm.

Aberturas: Tri-zonocolporado.

Ornamentação: Microreticulado ou microespinulado.

Alergenicidade: A sua alergenidade ainda não foi determinada.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração total de 9,18 grãos/ m³ de ar.

Concentrações médias mensais: Foram observadas ocorrências intermitentes ao longo dos anos, surgindo com 6,48 grãos/ m³ de ar em 2002, 1,08 e 1,62 grãos/m³ em 2003 e 2004, respectivamente (Fig. I 63).

Concentrações médias horárias: Ocorreu entre as 7 e as 9 horas, e entre as 17 e as 20 horas. O pico de concentração ocorreu às 7h, com 2,16 grãos/m³ de ar (Fig. I 64).

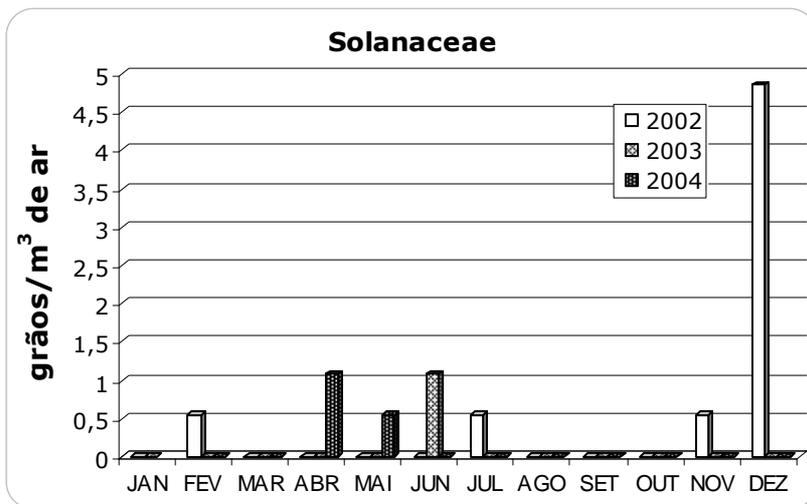


Fig. I 63. Distribuição mensal do pólen de Solanaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

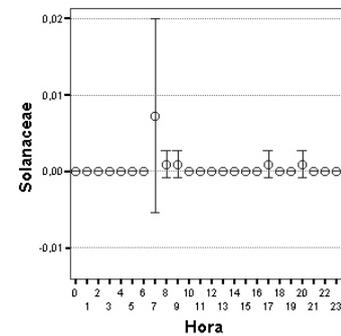


Fig. I 64. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Datura* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	25 de Julho a 16 de Dezembro

Período de Ocorrência:

2003	21 e 22 Junho
2004	29 de Abril; 3 de Maio

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 25. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Datura* (Solanaceae) e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,020	0,043	0,039	0,035	0,049	0,031

Da análise dos coeficientes de correlação, não se verifica a existência de uma correlação entre a concentração de pólen de *Datura* e as variáveis meteorológicas.

Urticaceae

Gêneros: *Parietaria*

Nome comum: Alfavaca

Porte: Herbácea

Ecologia e distribuição: Comum entre rochas, muros, paredes e ravinas, preferindo altitudes mais baixas.

Floração: Março a Dezembro

Polinização: Anemófila



MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Isopolar, esferoidal.

Tamanho: 13 a 17 μm .

Aberturas: Tri- ou tetraporado.

Ornamentação: Psilado-escábrico ou microverrugoso. Espínulas e verrugas de tamanho diverso e de distribuição irregular. Os grãos de pólen de *Parietaria* são distinguíveis de *Urtica* por apresentarem dimensão mais reduzida.

Alergenicidade: Espécie herbácea que induz com frequência polinose, asma e conjuntivite em indivíduos sensibilizados. Alergenicidade muito elevada.

Gêneros: *Urtica*

Nome comum: Urtiga, ortigas

Porte: Herbácea

Ecologia e distribuição: Comum em terrenos baldios, muros e paredes por toda a Ilha da Madeira.

Floração: A maioria das espécies floresce entre Março e Junho. *Urtica membranosa* floresce durante todo o ano.

Polinização: Anemófila

MORFOLOGIA POLÍNICA

Simetria e Forma: Apolar, esferoidal.

Tamanho: 13 a 19 μm de diâmetro.

Aberturas: Tri- ou Tetra-zonoporado, ou pantoporado.

Ornamentação: Espinulado, perfurado. Presença de microespínulas uniformemente distribuídas.

Alergenicidade: Com pouca relevância alérgica, embora em termos percentuais este *taxon* contribua significativamente para o total anual de uma região.

Concentrações totais anuais: Urticaceae ocorreu com uma concentração total de 289 grãos/ m^3 de ar, sendo de 162,32 grãos/ m^3 em 2003.

Concentrações médias mensais: As ocorrências incidiram sobretudo entre Abril e Junho, atingindo em Maio de 2004 o pico máximo de 73,44 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 65).

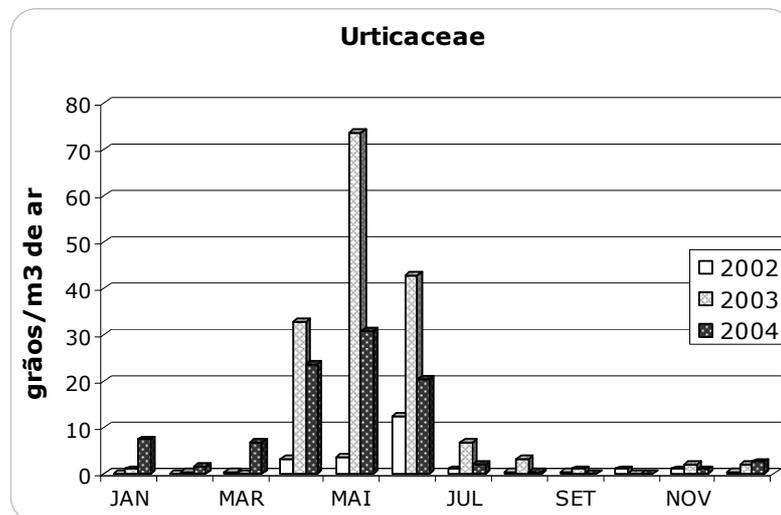


Fig. I 65. Distribuição mensal do pólen de Urticaceae na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

Concentrações médias horárias: Ocorreu ao longo de todo o dia surgindo com maior expressão entre as 11 e as 16 horas, com uma concentração média de 10,9 grãos/ m^3 de ar (Fig. I 66).

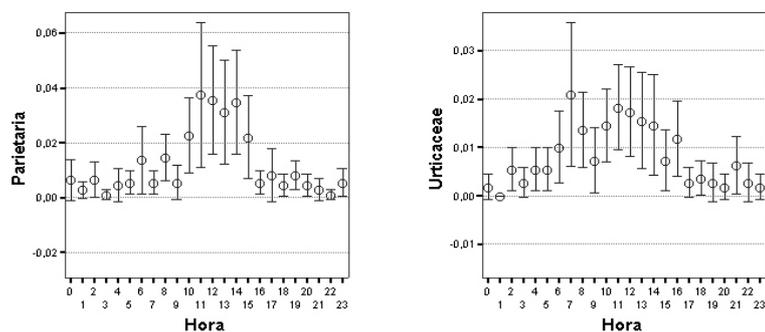


Fig. I 66. Intervalo de confiança (95%) do número médio de pólenes de *Parietaria* e *Urticaceae* por hora.

Período de Polinização Principal (P.P.P.):

ANO	PERÍODO
2002	19 de Abril a 10 de Novembro
2003	12 de Abril a 14 de Agosto
2004	18 de Janeiro a 18 de Junho

Efeito das variáveis meteorológicas:

Tabela I 26. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre a concentração de pólen de *Urticaceae* e as principais variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do vento
r	0,332*	0,351*	0,386*	-0,182*	0,117*	0,032

A análise de correlação sugere a influência positiva da temperatura e precipitação na concentração deste pólen, e negativa, da humidade relativa.

2. Análise Aeromicológica Global

O total de esporos de fungos, incluindo os esporos de fetos, contabilizado no período 2002-2004 da atmosfera do Funchal foi de 12.225,12/m³ de ar. Em 2003 registaram-se as concentrações mais elevadas de esporos (7819,7 esporos/m³ de ar), em 2004 (3784,9 esporos/m³ de ar) e 620,5 (esporos/m³ de ar) em 2002 (Fig. I 67). A concentração média anual foi de 4075 esporos/m³ no período em estudo.

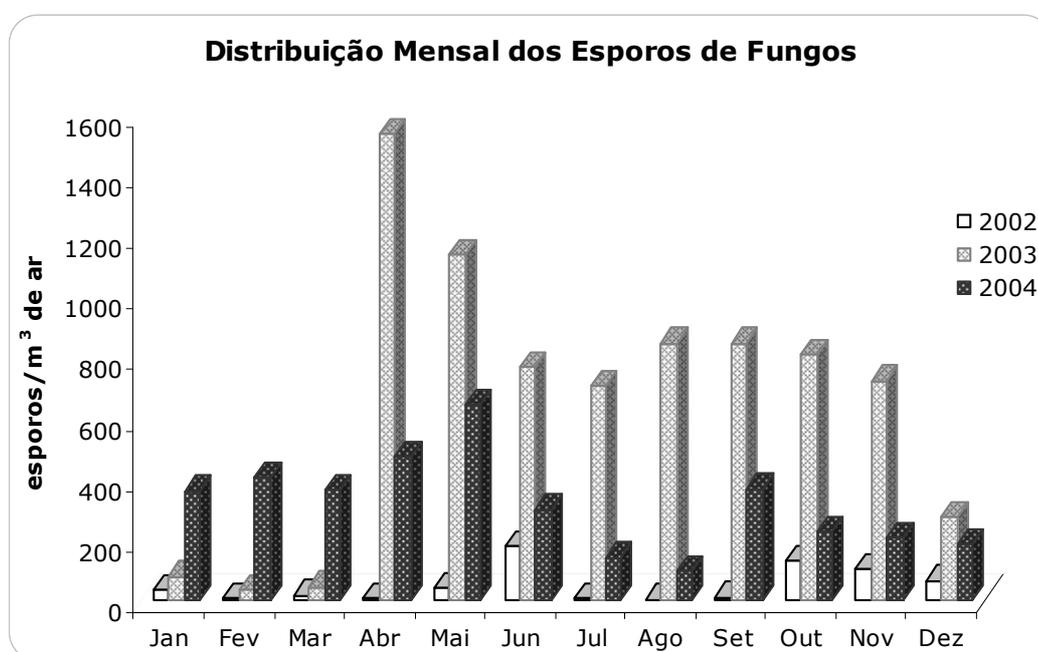


Fig. I 67. Flutuações mensais dos esporos de fungos na cidade do Funchal (2002-2004).

Os meses em que se observaram as ocorrências mais elevadas de esporos de fungos foram os meses de Abril e Maio. A concentração de fungos foi mais baixa no Verão (Junho-Agosto), bem como entre Dezembro e Março.

O número total de taxa observados durante o período de estudo foi de 42, seis dos quais são de fetos, contabilizando-se uma média de 32 taxa por ano (Tabelas I 27-29).

Tabela I 27. Contagens totais de esporos e contribuição percentual dos taxa em 2002 na cidade do Funchal (esporos/m³ de ar).

Taxa	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total	%
<i>Adiantum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	0	0,54	0,54	1,62	0,26
<i>Alternaria</i>	0	1,08	0	0	0	1,08	0	0,54	0	2,16	1,08	3,24	9,18	1,48
<i>Anthrinium</i>	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,09
<i>Ascosporos</i>	6,48	0,54	0	0,54	1,08	0,54	4,276	0	2,7	4,32	24,3	3,78	48,556	7,83
<i>Botrytis</i>	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0,54	0	0	0	1,08	0,17
<i>Cladosporium</i>	12,96	1,08	5,94	3,78	1,62	5,4	37,27	4,86	161	74,52	99,9	45,36	453,7	73,12
<i>Coprinus</i>	0,54	0	0	0,54	0	0	0	0,54	3,24	9,18	1,62	2,7	18,36	2,96
<i>Curvularia</i>	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,09
<i>Drechslera</i>	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,09
<i>Fusarium</i>	0,54	0	0	0	0	0	0	0	3,24	2,16	0	0,54	6,48	1,04
<i>Ganoderma</i>	0	0	1,08	0	0	1,62	0	0	2,16	0,54	1,08	0,54	7,02	1,13
<i>Leptosphaeria</i>	7,56	1,08	0,54	0,54	0,54	1,62	0	1,62	4,86	8,1	0,54	3,78	30,78	4,96
Mixomicetes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,24	3,24	0,52
<i>Nigrospora</i>	0	0	0	2,16	0	0	0	0	0	0	0	0,54	2,7	0,44
<i>Periconia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,54	0,09
<i>Pleospora</i>	1,62	0	0	1,62	0	0	0,54	0	0	1,08	0	0	4,86	0,78
<i>Polypodium</i>	0	0	0	2,16	0,54	0	0	0,54	0	0	0,54	0,54	4,32	0,70
<i>Sphagnum</i>	0	0	0	2,16	0,54	0	0	0	0	0	0	0	2,7	0,44
<i>Stemphylium</i>	2,16	0	0	1,62	0	0,54	0,54	1,08	0	0	0	0	5,94	0,96
<i>Torula controversa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	0,54	0,09
<i>Torula</i>	0,54	0	1,08	1,08	0	1,08	1,62	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	8,1	1,31
<i>Uredosporo</i>	0,54	0	0	0	0	0	0	0	2,16	0	0	0	2,7	0,44
<i>Ustilago</i>	0,54	0	0	1,08	0	0	0	0,54	0	0	0	0	2,16	0,35
<i>Venturia</i>	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	1,08	0,17
<i>Xilaria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,08	1,08	0,17
NI (Não identificado)	2,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,16	0,35
	36,7	3,78	9,18	18,4	4,32	11,9	44,2	10,8	180	103	131	67	620,52	

Tabela I 28. Contagens totais de esporos e contribuição percentual dos taxa em 2003 na cidade do Funchal.

<i>Taxa</i>	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	<i>Total</i>	%
<i>Agaricus</i>	0	0	0	0	110,7	1,08	3,78	1,62	2,16	2,7	42,66	68,04	232,74	2,98
<i>Alternaria</i>	0,54	0,54	0,54	21,06	36,72	15,66	3,24	14,04	17,82	11,88	14,04	4,32	140,4	1,80
<i>Arthrinium</i>	0	0	0	0	8,1	0	0	0	0	0	0	0	8,1	0,10
<i>Ascosporos</i>	36,72	1,08	15,66	186,8	4,32	0,54	0,54	14,04	73,44	25,92	22,68	2,7	384,48	4,92
<i>Botrytis</i>	0	0	0	0,54	0	7,56	0	0	0	0	0	0	8,1	0,10
<i>Cladosporium</i>	30,78	21,6	13,5	532,4	374,8	410,9	518,4	541,1	383,4	523,8	272,7	62,64	3686	47,14
<i>Coprinus</i>	4,86	0	5,4	125,8	124,2	18,36	12,42	5,94	7,56	23,76	53,46	38,88	420,66	5,38
<i>Curvularia</i>	0	0	0	0,54	2,7	0	1,08	15,66	3,24	1,62	1,62	0,54	27	0,35
<i>Drechslera</i>	0	8,1	0	10,26	24,3	15,66	3,78	11,88	5,94	4,86	1,08	1,08	86,94	1,11
<i>Epicoccum</i>	0	0	0	0	2,16	0,54	0	2,16	2,16	1,08	0	0	8,1	0,10
<i>Fusarium</i>	0	0	0	5,4	2,7	4,32	10,8	0	1,62	2,7	9,72	3,78	41,04	0,52
<i>Ganoderma</i>	0	0	0,54	21,6	71,82	73,44	42,12	57,78	157,1	35,64	36,72	23,22	520,02	6,65
<i>Gliomastix</i>	0	0	0	1,08	0	0	0	0	0	0	0	5,94	7,02	0,09
<i>Isthimosphora</i>	0	0	0	0	2,16	0	0	0	0	0	0	0	2,16	0,03
<i>Leptosphaeria</i>	2,16	1,08	5,94	438,5	61,02	20,52	3,78	10,8	36,72	72,36	172,3	31,32	856,44	10,95
<i>Microsporum</i>	0	0	0	6,48	0	0	0	0	0	0	0	0	6,48	0,08
<i>Nigrospora</i>	0	0	0	3,24	7,02	0,54	2,16	8,64	9,72	5,4	1,08	2,7	40,5	0,52
<i>Pithomyces</i>	0	0	0	1,62	0	0	0	0	0	0	0	0	1,62	0,02
<i>Pleospora</i>	1,08	0,54	0	12,96	17,28	3,24	12,42	9,18	4,32	7,56	20,52	3,78	92,88	1,19
<i>Polythrincium</i>	0	0	0	0,54	17,82	1,08	0	0	0	0,54	0,54	0,54	21,06	0,27
<i>Polypodium</i>	0	0	0	0	1,08	0	2,16	16,2	8,64	14,58	4,32	1,62	48,6	0,62
<i>Prosthemium</i>	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,01
<i>Pteridophyta</i>	0	0	0	0	0	0	3,78	33,48	66,42	18,36	2,7	0	124,74	1,60
<i>Puccinia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,64	2,7	11,34	0,15
<i>Sordaria</i>	0	0	2,16	0	0	2,7	0	0	0	0	0	0	4,86	0,06
<i>Spegazzinia</i>	0	0	0	2,16	38,34	2,16	14,04	5,94	0,54	0,54	0	0	63,72	0,81
<i>Stemphylium</i>	0	0	0,54	9,72	5,4	9,72	1,62	2,16	2,16	1,62	0,54	0	33,48	0,43
<i>Tetraploa</i>	0	0	0	0	0	0	0	2,7	0	3,24	5,4	0	11,34	0,15
<i>Torula</i>	1,62	2,7	0	38,88	114,5	36,18	17,28	18,9	15,66	11,88	15,66	4,32	277,56	3,55
<i>Uredosporo</i>	0,54	0	0,54	48,6	45,9	44,82	32,4	56,16	18,9	12,42	19,98	14,04	294,3	3,76
<i>Ustilago</i>	0	0	0	0,54	2,16	0	0	0	0	0	0	0	2,7	0,03
<i>Venturia</i>	0,54	0	0	57,24	62,1	99,36	20,52	18,36	24,84	27,54	13,5	4,86	328,86	4,21
<i>Xilaria</i>	0	0	0	4,32	0	0	0	0	0	0	0	0	4,32	0,06
Diversos NI (Não identificado)	0	0	0	0	0	0	0	1,62	5,4	0	3,78	0	10,8	0,14
	79,9	35,6	44,8	1537	1138	768	707	849	849	810	724	277	7819,7	

Tabela I 29. Contagens totais de esporos e contribuição percentual dos taxa em 2004 na cidade do Funchal.

<i>Taxa</i>	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	<i>Total</i>	<i>%</i>
<i>Agaricus</i>	23,76	5,94	1,08	21,06	36,18	19,98	0,54	0	5,4	14,58	22,14	42,66	193,32	5,12
<i>Alternaria</i>	3,78	19,98	24,3	9,72	19,44	15,66	3,24	1,62	16,74	12,42	10,26	2,16	139,32	3,69
<i>Arthrinium</i>	2,7	1,08	15,12	3,24	0	0,54	0	1,62	0	0	0	0	24,3	0,64
<i>Ascosporos</i>	18,36	103,7	92,34	93,42	86,94	4,86	1,08	0	0	0	7,02	3,78	411,48	10,90
<i>Botrytis</i>	11,34	10,26	1,62	7,56	11,34	7,02	0	0	0	0	0	1,08	50,22	1,33
<i>Cercospora</i>	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	1,08	1,62	0,04
<i>Chaetomium</i>	0	1,08	0,54	0,54	1,08	2,7	0	0,54	0,54	0	0	0	7,02	0,19
<i>Cladosporium</i>	139,9	126,9	123,1	137,7	274,9	132,3	36,18	44,28	174,4	66,96	17,82	13,5	1287,9	34,12
<i>Coprinus</i>	39,42	14,58	31,32	52,38	38,34	11,34	4,32	1,08	7,56	5,4	8,64	12,42	226,8	6,01
<i>Curvularia</i>	0	0	0,54	0	0,54	0,54	0	0	0	0	0	0	1,62	0,04
<i>Drechslera</i>	3,78	0,54	1,08	2,16	5,4	2,7	2,7	1,08	0	0,54	0,54	1,62	22,14	0,59
<i>Dryopteris</i>	1,62	0	0	0	0	0	0	3,24	4,86	1,08	2,16	0,54	13,5	0,36
<i>Pteridium</i>	1,08	0	0	0	0	2,16	6,48	6,48	17,82	0	4,86	0	38,88	1,03
<i>Polypodium</i>	0	0,54	0,54	0	0	0,54	0	1,62	0	0	0	0	3,24	0,09
<i>Entomophthora</i>	0	1,08	0	0	2,7	0	0	0	0	0	0	0	3,78	0,10
<i>Epicoccum</i>	0,54	0	1,08	4,86	3,24	3,78	4,32	3,24	1,08	0	0	0	22,14	0,59
<i>Fusarium</i>	19,98	34,02	25,38	27	45,9	5,94	0,54	0	32,94	3,24	22,68	10,8	228,42	6,05
<i>Ganoderma</i>	22,68	26,46	13,5	16,2	24,84	22,68	10,8	12,96	53,46	8,64	16,74	7,56	236,52	6,27
<i>Gliomastix</i>	2,16	0	0,54	1,08	4,86	2,7	0	0	0	1,08	5,4	2,7	20,52	0,54
<i>Helicomyces</i>	0	0	0	1,08	0,54	0	0	0	0	0	0	0	1,62	0,04
<i>Leptosphaeria</i>	10,26	1,62	0	16,74	2,7	4,32	1,62	3,24	22,14	72,9	36,18	58,32	230,04	6,10
<i>Lophiostoma</i>	0	1,08	0	0	0	0	0	0	1,08	5,4	7,02	2,16	16,74	0,44
<i>Massarina</i>	0,54	0	0,54	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	1,62	0,04
<i>Melazzinia</i>	0	0	0	0	0	1,08	0	0	0	0	0	0	1,08	0,03
<i>Nigrospora</i>	7,56	0,54	1,08	2,16	2,7	1,62	1,62	3,78	3,78	5,94	3,24	4,86	38,88	1,03
<i>Periconia</i>	7,02	3,24	2,7	0,54	4,32	0,54	4,32	0	1,08	3,78	2,16	0	26,46	0,70
<i>Pleospora</i>	4,32	3,78	2,16	5,94	17,82	1,62	1,62	2,16	3,78	1,62	1,62	1,08	47,52	1,26
<i>Polythrincium</i>	0	0	0,54	1,08	0	1,08	0	0	0	0	0	0	2,7	0,07
<i>Puccinia</i>	3,24	7,56	1,08	4,32	0	0	0	0	0	0,54	0,54	0	17,28	0,46
<i>Sordaria</i>	0,54	2,7	1,08	1,08	3,78	2,7	0	0	0,54	0	0	0	12,42	0,33
<i>Spegazzinia</i>	1,62	0	0	0,54	0	0,54	0,54	0	0	0	0,54	0	3,78	0,10
<i>Splanchonema</i>	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0,01
<i>Stemphylium</i>	3,78	1,62	0,54	6,48	2,16	3,78	2,7	0,54	1,08	2,16	2,16	3,24	30,24	0,80
<i>Tetraploa</i>	0	0	0	0	0	0,54	0	0	0	0	0	0	0,54	0,01
<i>Torula</i>	7,56	2,16	2,16	18,9	11,34	16,2	11,88	1,62	3,24	5,4	8,64	2,7	91,8	2,43
<i>Uredosporo</i>	1,62	5,94	6,48	1,62	0,54	2,7	24,84	1,08	0,54	0,54	0,54	1,08	47,52	1,26
<i>Venturia</i>	17,82	16,74	5,94	10,8	18,9	17,82	2,16	0,54	2,7	5,94	12,42	8,1	119,88	3,18
<i>Xilaria</i>	1,08	0	0,54	0,54	4,86	1,08	0	0	0	0,54	0	0	8,64	0,23
NI (Não identificado)	0	1,08	0	0	0	1,08	0	0	0,54	0,54	0,54	0	3,78	0,10
Diversos	1,08	11,88	8,64	23,22	20,52	8,1	21,6	7,56	12,96	3,78	9,72	4,86	133,92	3,55
	360	406	367	473	646	300	143	97,2	368	223	204	186	3774,1	

No período de estudo a classe predominante foi a dos Deuteromicetes (56,87%), logo seguido dos Ascomicetes (21,76%) e dos Basidiomicetes (17,84%) (Fig. I 68).

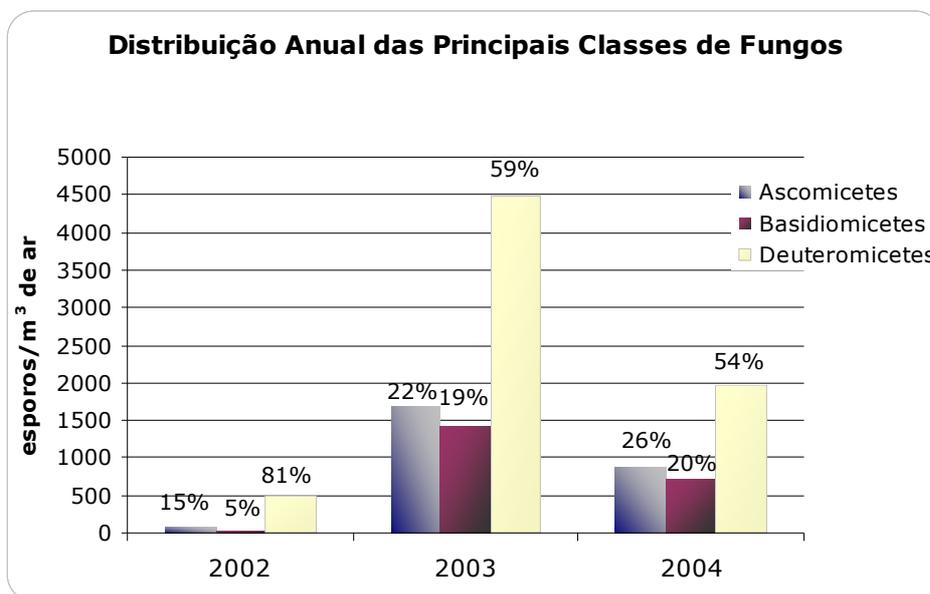


Fig. I 68. Percentagens da representação anual de Asco-, Basidio- e Deuteromicetes.

A distribuição mensal das principais classes revelou um padrão irregular ao longo dos anos, embora a ocorrência tivesse um carácter perianual (Fig. I 69-70). Os Ascomicetes e Basidiomicetes ocorreram sobretudo na Primavera e no Outono, registando-se os valores mais baixos nos meses de Julho e Agosto, e os mais elevados, em Abril e Maio. Os Deuteromicetes tiveram maior expressão entre os meses de Abril e Dezembro, registando picos em Maio e Setembro.

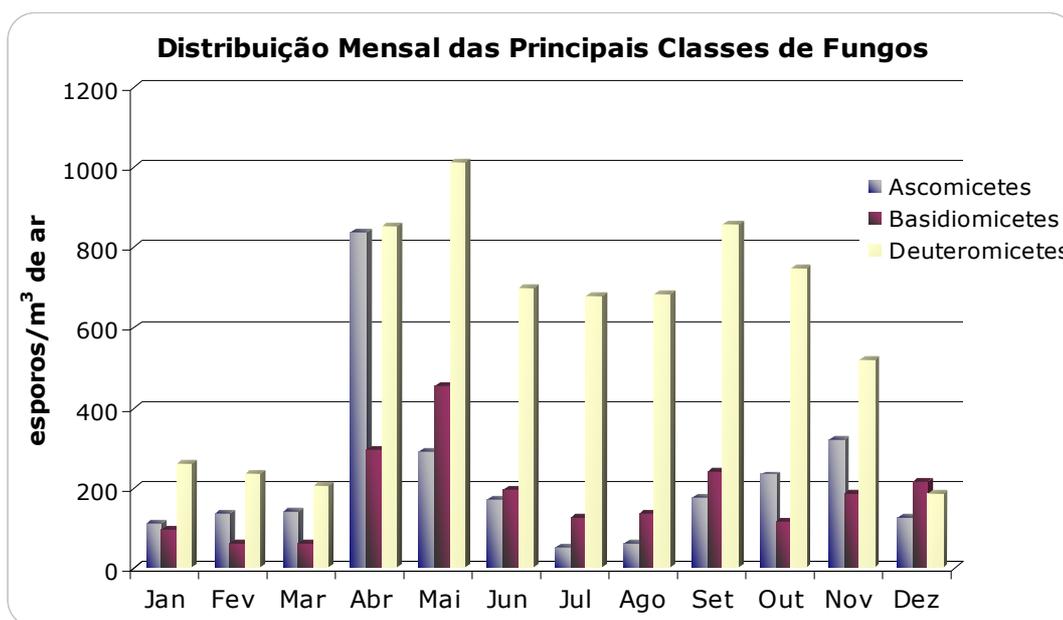


Fig. I 69. Variação mensal da concentração de esporos pertencentes às principais classes de fungos (2002-2004).

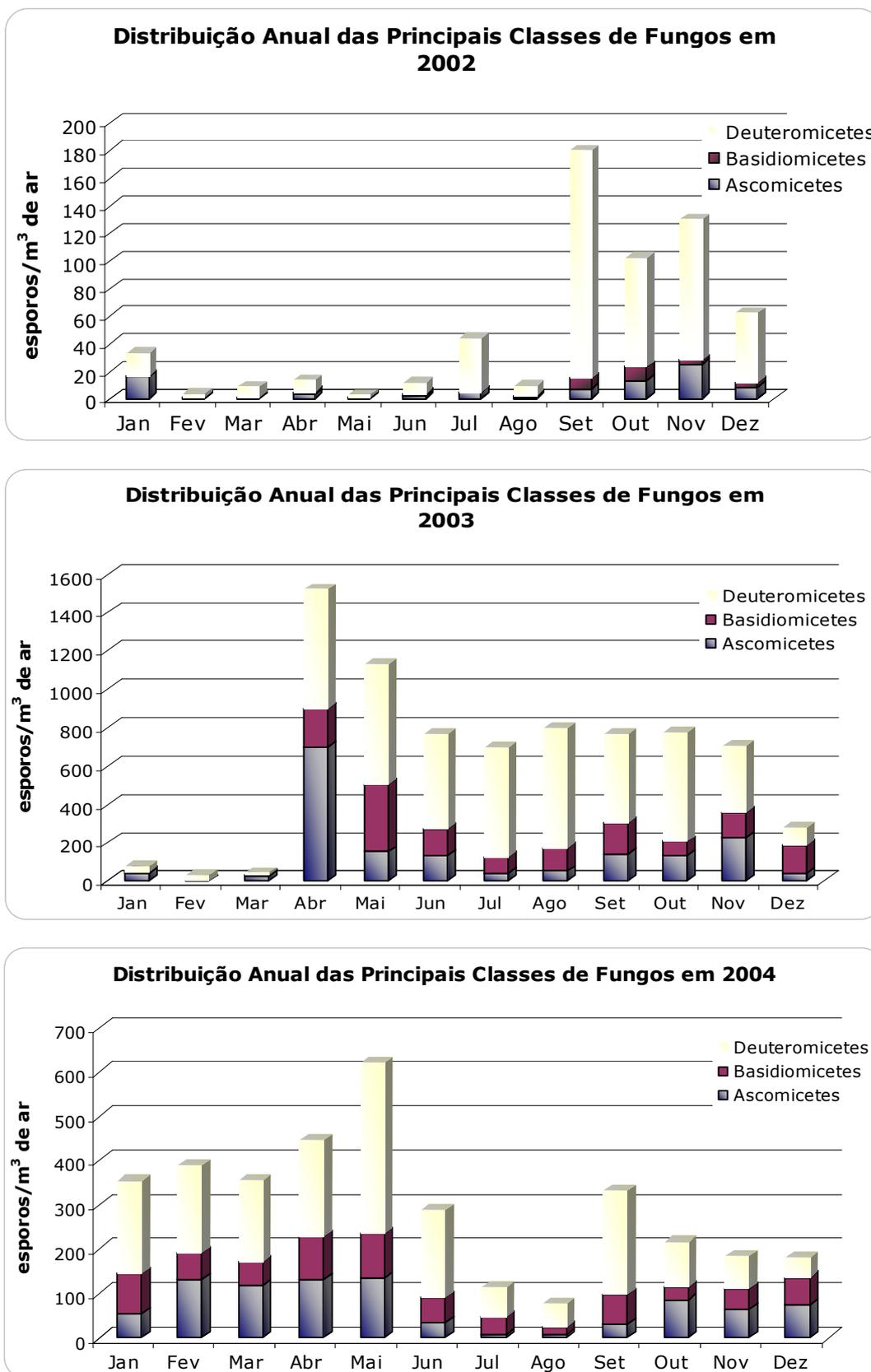


Fig. I 70. Distribuição mensal das principais classes de fungos (2002-2004).

Os esporos de fetos totalizaram 1,94 % das observações, seguindo-se o grupo designado "Diversos" que incluem os tipos de esporos e partículas cuja concentração foi inferior a 8 esporos/m³ de ar em todo o período de estudo. Os esporos não indentificados ou "NI" variaram entre os 0,10 e 0,35% (Fig. I 71-73).

O fungo mais frequente no período de estudo foi *Cladosporium*, totalizando 45,6% do total global e em média, 80% dos Deuteromicetes. Seguiram-se *Coprinus*, *Leptosphaeria*, *Ganoderma*, *Alternaria* e *Fusarium*, como os mais prevalentes (Fig. I 74-75).

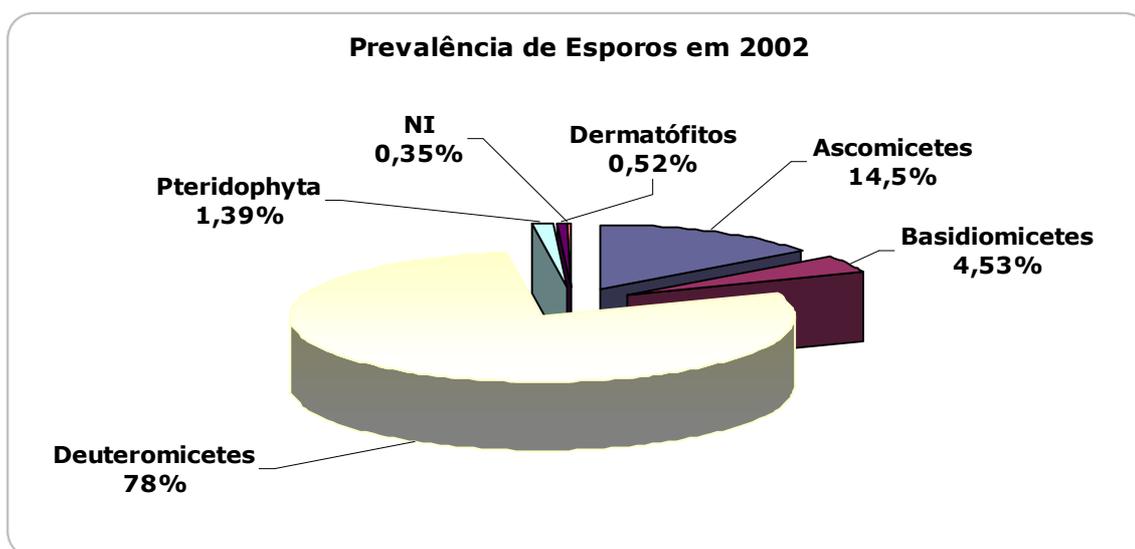


Fig. I 71. Principias classes e tipos de esporos observados em 2002.

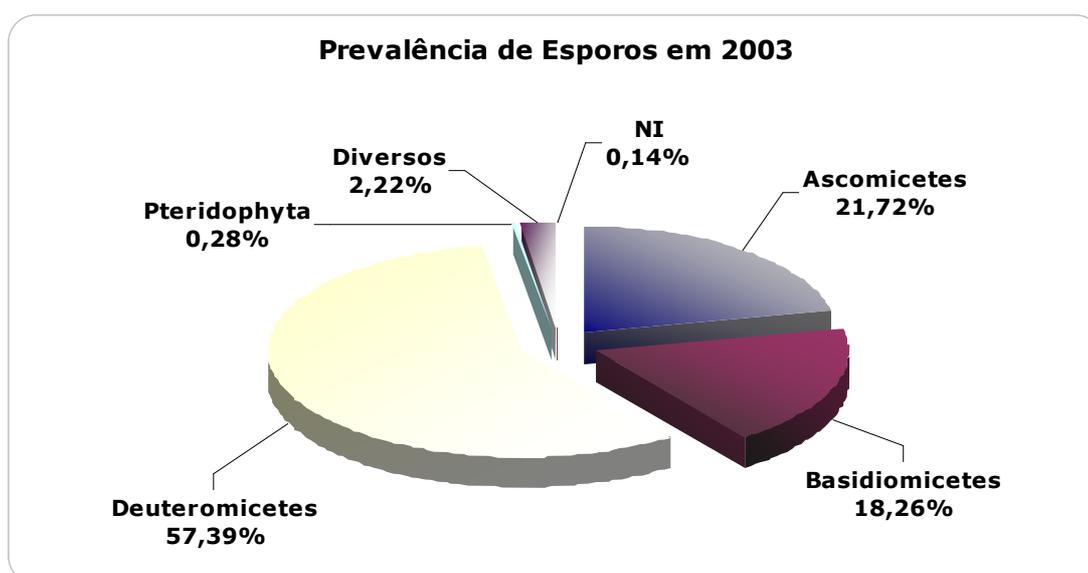


Fig. I 72. Principias classes e tipos de esporos observados em 2003.

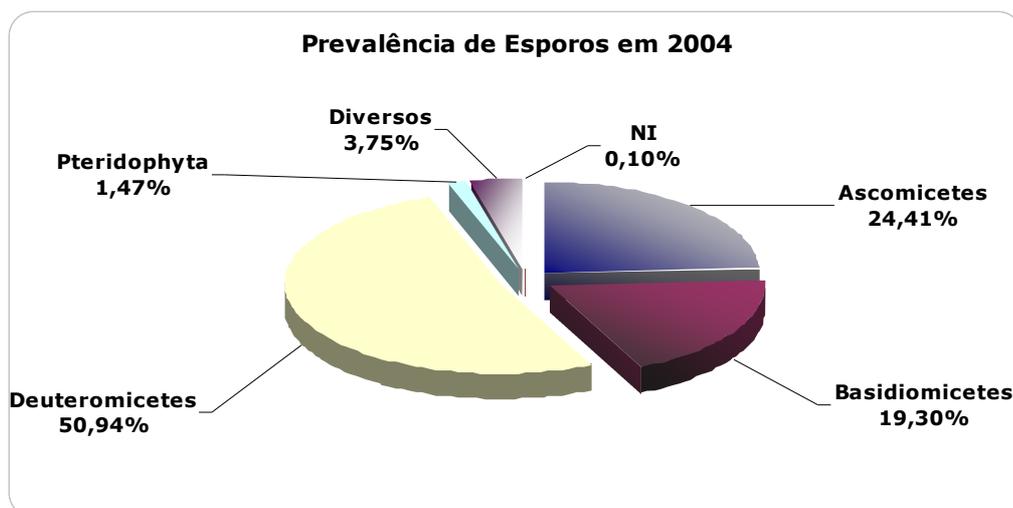


Fig. I 73. Principais classes e tipos de esporos observados em 2004.

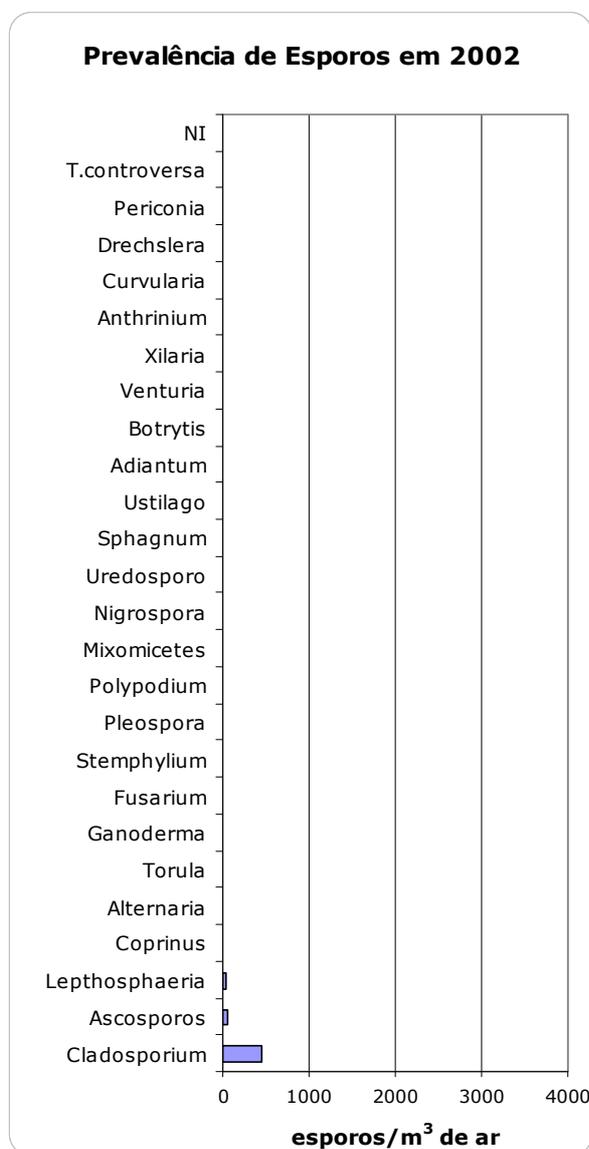


Fig. I 74. Proporção dos tipos de esporos identificados em 2002.

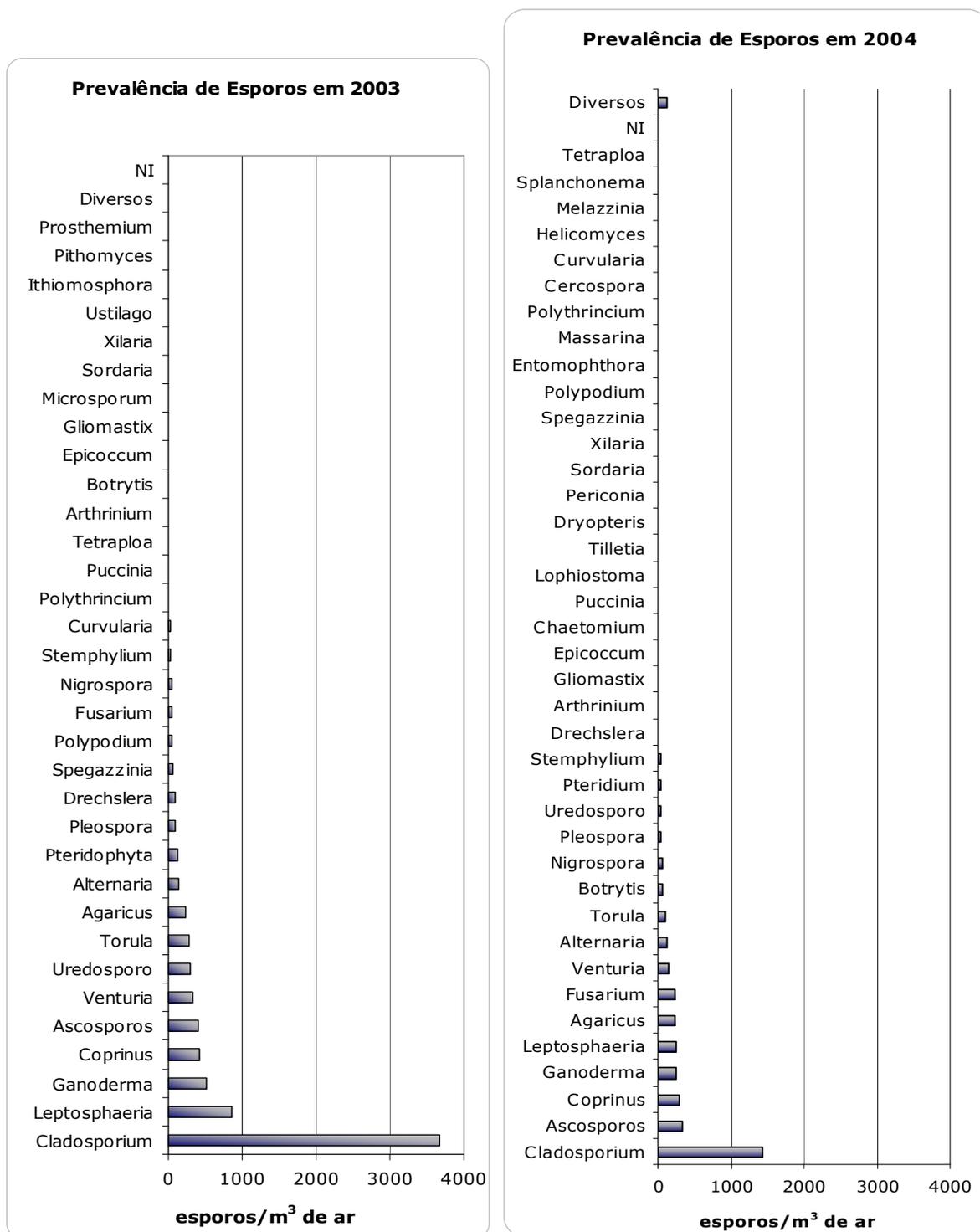


Fig. I 75. Proporção dos tipos de esporos identificados em 2003 e em 2004.

As médias das frequências horárias foram mais elevadas entre as 12 e 13 horas em 2002 e entre as 14 e 15 horas em 2003. Em 2004 o padrão de frequências foi irregular, contabilizando-se partículas ao longo de todo o dia, sobretudo na madrugada, início da tarde e noite (Fig. I 76).

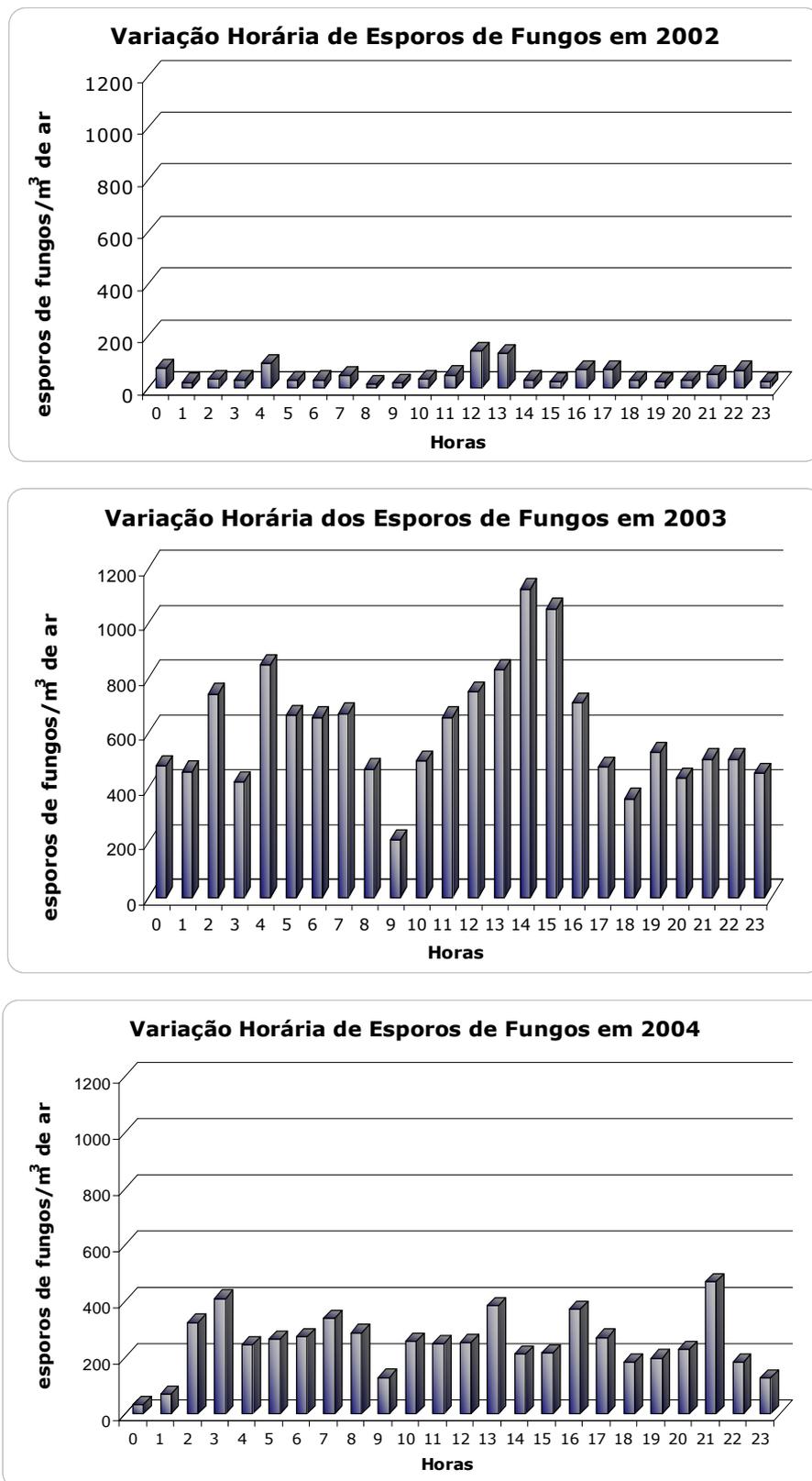


Fig. I 76. Variação horária dos esporos de fungos (2002-2004).

Da análise de intervalos de confiança para o total global, observa-se que os esporos de fungos ocorreram em maior concentração entre as 13 e 15 horas, surgindo igualmente nas primeiras horas da madrugada (02-04 horas) e noite (20-22 horas) (Fig. I 77). Tal padrão foi bem evidente nos Deuteromicetes, com uma ocorrência preferencial à tarde. Os Ascomicetes e Basidiomicetes foram observados sobretudo na madrugada, atingindo as concentrações mais baixas entre as 8 e as 9 horas, vindo a aumentar no fim da tarde, início da noite.

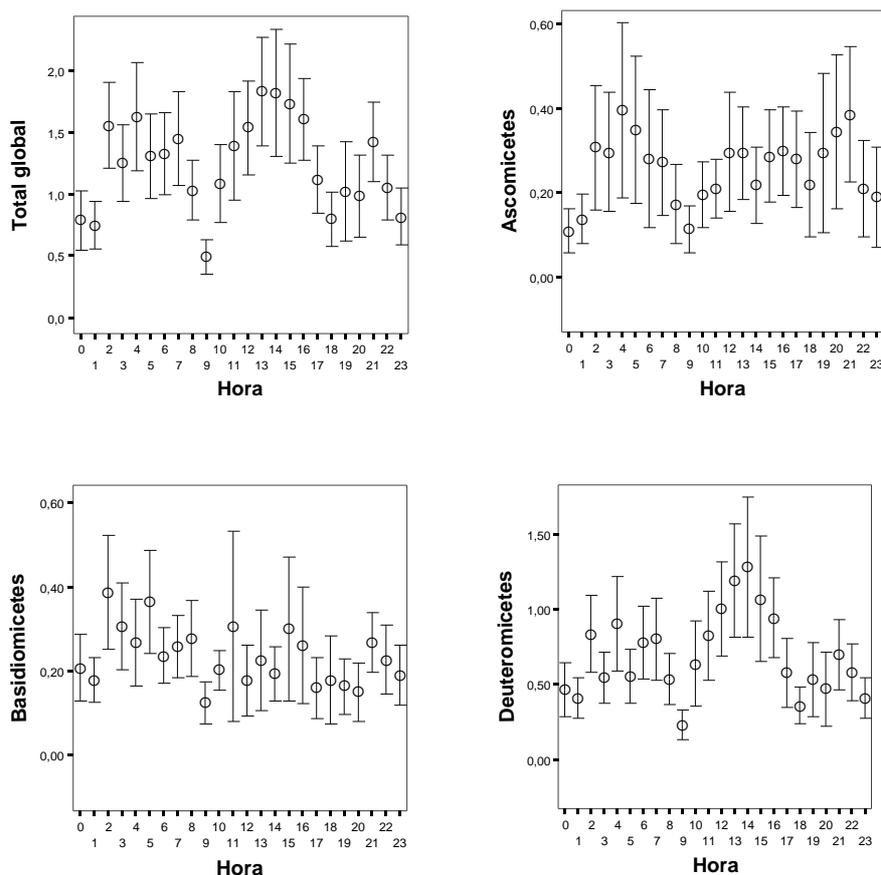


Fig. I 77. Variação do número médio esporos de fungos por hora.

Da análise de "clusters" para o número de fungos e as variáveis ambientais, verificou-se que o aumento do número de fungos está correlacionado positivamente com a humidade, nomeadamente entre os 60 e os 70% (Fig. I 78 A), Por outro lado, à medida que o número de fungos aumenta, evidencia-se a representatividade dos esporos de Deuteromicetes (Fig. I 78 B).

Da análise de correlação entre fungos e as variáveis meteorológicas, observou-se uma correlação positiva entre a humidade relativa, as principais classes de fungos e o número total de fungos (Tabelas I 30). Igual correlação foi observada entre os Deuteromicetes e as variáveis temperatura e humidade, bem como entre o total de fungos e a humidade.

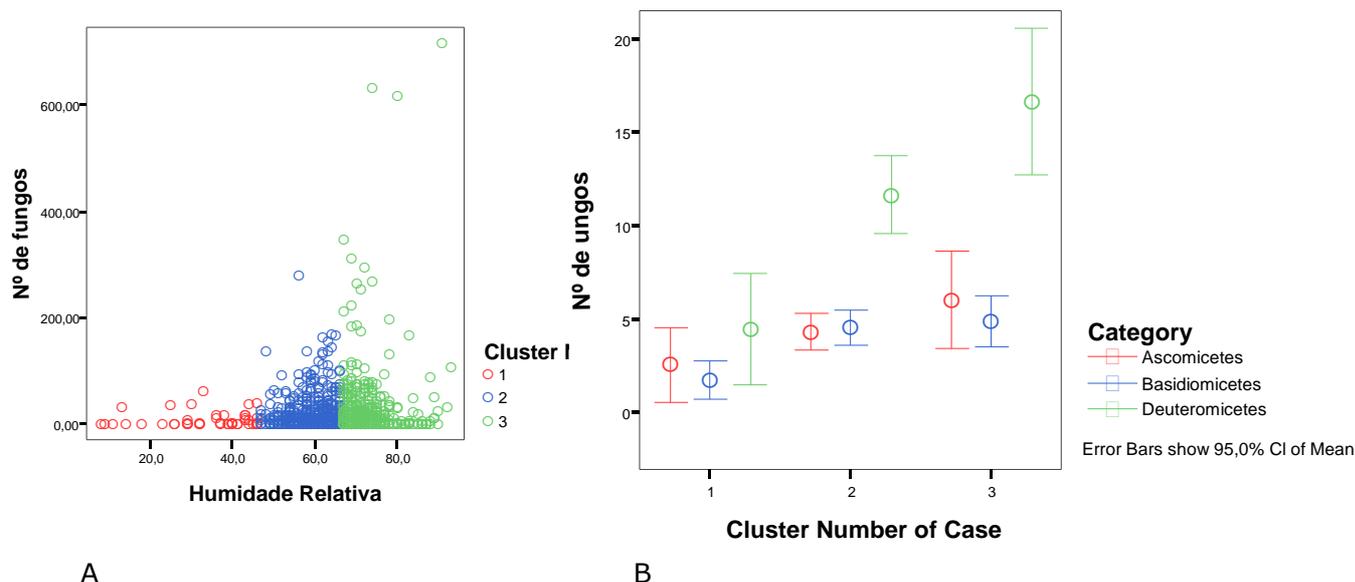


Fig. I 78. A. Distribuição conjunta do número de fungos e a humidade relativa, para cada "cluster". **B.** Número de fungos por classes, em cada "cluster".

A concentração de Ascomycetes esteve correlacionada positivamente com a humidade, sendo igualmente significativa, mas de sinal negativo, com a temperatura máxima. No geral, a incidência de fungos foi maior quando o vento soprou do quadrante Oeste.

A análise de Spearman entre os tipos polínicos referenciados e as principais classes de fungos, mostra uma correlação fraca de sinal positivo. A correlação foi moderada de sinal positivo entre 6 taxa polínicos e os taxa das principais classes de fungos (Tabela I 31).

Tabela I 30. Coeficientes de Correlação de Spearman entre as concentrações horárias dos esporos das principais classes de fungos, o Número Total de Fungos, e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
Ascomycetes	-0,050	-0,274*	-0,057	0,307**	-0,005	-0,140*
Basidiomycetes	-0,003	-0,011	0,008	0,030	-0,035	-0,112**
Deuteromycetes	0,109**	0,084*	0,117**	0,098**	-0,021	-0,192**
Total de Fungos	0,049	0,023	0,054	0,108**	-0,024	-0,108**

A análise sugere a existência de correlação entre a concentração de esporos de *Alternaria* e do pólen de *Parietaria*. Igual correlação foi encontrada entre aquele pólen e outros esporos de fungos. (Tabela I 32).

Tabela I 31. Coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações de pólenes e as principais classes de fungos. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Nº de fungos	Ascomicetes	Basidiomicetes	Deuteromicetes
<i>Artemisia</i>	-0,017	-0,029	-0,071	0,005
Asteraceae	-0,026	-0,003	-0,031	-0,027
Boraginaceae	-0,003	0,013	0,012	-0,018
Cheno.-Amaranthaceae	0,129	0,153*	0,152*	0,111*
<i>Corylus</i>	0,224**	0,183**	0,204**	0,216**
Cupressaceae	0,168**	0,178**	0,187**	0,174**
<i>Datura</i>	0,058	0,043	0,052	0,064*
Ericaceae	0,104**	0,100**	0,124**	0,099**
<i>Ginkgo</i>	0,072*	0,089**	0,080*	0,070*
Fabaceae	0,046	0,075*	0,057	0,046
Myrtaceae	0,191**	0,191**	0,201**	0,189**
<i>Myrica</i>	0,128**	0,122**	0,134**	0,122**
Nyctaginaceae	0,047	0,061	0,047	0,040
<i>Parietaria</i>	0,284**	0,240**	0,281**	0,297**
Pinaceae	0,134**	0,133**	0,104**	0,120**
<i>Plantago</i>	0,066	0,077*	0,088**	0,069*
Platanaceae	0,039	0,050	0,043	0,041
Poaceae	0,012	-0,020	0,033	0,033
<i>Robinia</i>	0,143	0,089**	0,169**	0,134**
<i>Rumex</i>	0,091	0,097**	0,048	0,081*
Solanaceae	-0,036	-0,071	-0,031*	-0,039
Urticaceae	0,142**	0,115**	0,164**	0,117**

Tabela I 32. Coeficientes de correlações de Spearman entre as concentrações de pólenes e esporos de fungos: Nível de significância: ** $p < 0,01$.

POLÉN	FUNGO	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Coprinus</i>	<i>Drechslera</i>	<i>Ganoderma</i>	<i>Leptosphaeria</i>
<i>Parietaria</i>		0,218**	0,279**	0,201**	0,274**	0,290**	0,260**

POLÉN	FUNGO	Botrytis	Puccinia
Pinaceae		0,234**	0,245**

POLÉN	FUNGO	Torula
<i>Corylus</i>		0,224**
Cupressaceae		0,207**
Myrtaceae		0,247**
Nyctaginaceae		0,332**

A análise dos coeficientes de correlação entre os fungos e a direcção do vento (Fig. I 79). É similar à realizada para os pólenes (ver página 59). Assim,

(i) Para uma correlação significativa de sinal positivo, a ocorrência de esporos de fungos aumenta com o vento a predominar do quadrante Oeste, tendendo para N-NW caso o valor de r seja elevado.

(ii) Para uma correlação significativa de sinal negativo, a ocorrência de esporos de fungos aumentou com o vento a predominar do quadrante Este, tendendo para NE no caso do valor de r ser mais elevado.

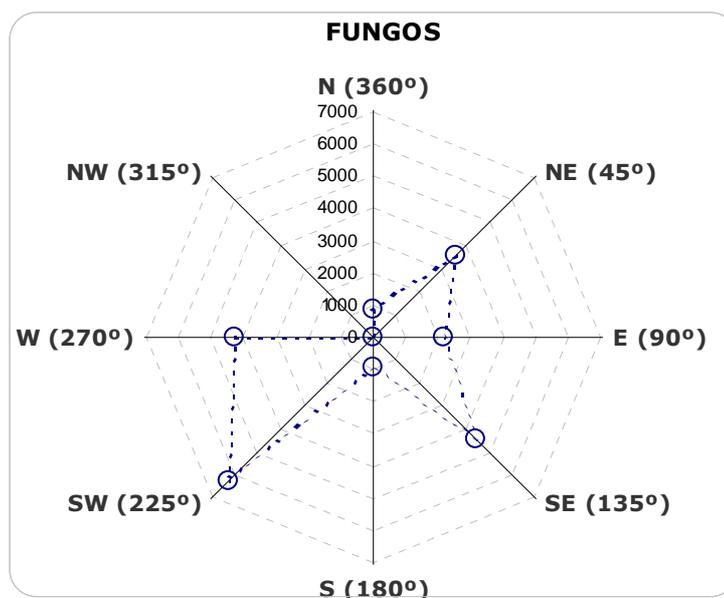


Fig. I 79. Total de fungos observados segundo os quadrantes da direcção do vento.

A distribuição mensal dos esporos de fungos apresenta uma dinâmica de variação semelhante aos pólenes entre os meses de Março e Julho (Fig. I 80). Entre Agosto e Novembro a representação dos fungos é superior aos pólenes.

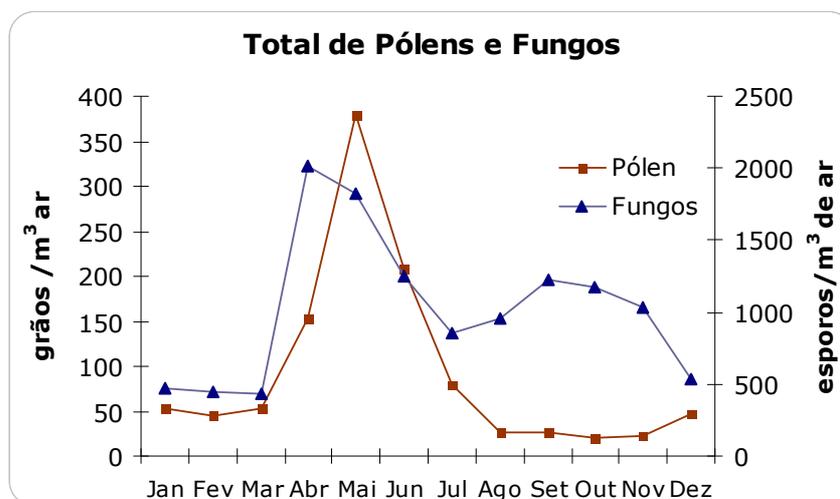


Fig. I 80. Dinâmica das concentrações mensais de pólenes e Fungos no Funchal (2002-04).

Tipos de Esporos

Agaricus (L. 1753)

Família: Agaricaceae

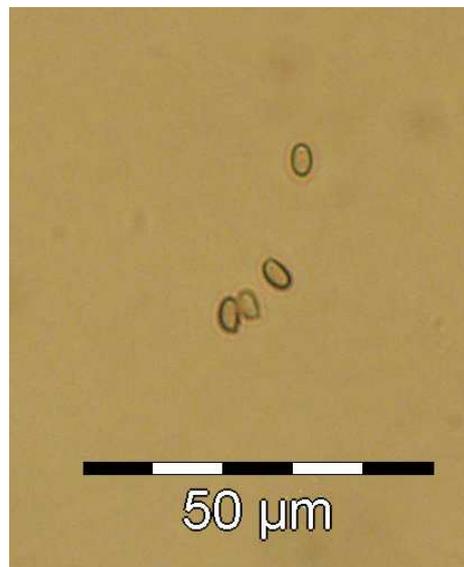
Ordem: Agaricales

Classe: Basidiomycetes

Subdivisão: Basidiomycotina

Divisão: Eumycota

Distribuição: Fungo de distribuição ampla.



Morfologia dos esporos: Ovóides, de aspecto liso, coloração amarela ou castanha. Dimensões médias: 5-9 X 3-6 µm (ver Lâmina 1. A, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Saprófito, decompositor de madeira e matéria vegetal. Algumas espécies são parasitas, outras formam micorrizas. Desenvolve-se essencialmente no ambiente "outdoor".

Alergenicidade: Foram documentados em alguns pacientes atópicos, testes cutâneos positivos a extractos de *Agaricus*, embora os estudos sobre a actividade clínica deste fungo sejam escassos.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2003 e 2004 com uma concentração média de 233 esporos/m³ de ar. Em 2003 surgiu a partir de Maio e, em 2004 apareceu com maior expressão durante o Verão com uma média de 20 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: Os picos de ocorrência surgiram em Maio (110,7 esporos/m³ de ar em 2003 e 47,52 esporos/m³ de ar em 2004), observando-se um novo pico em Dezembro de 2003 com 68 esporos/m³ de ar (Fig. I 81).

Concentrações médias horárias: No período em estudo surgiram dois picos de ocorrência: um de madrugada (03h) e outro à noite (22h), com uma média de 22 e 13 esporos/m³ de ar, respectivamente (Fig. I 82).

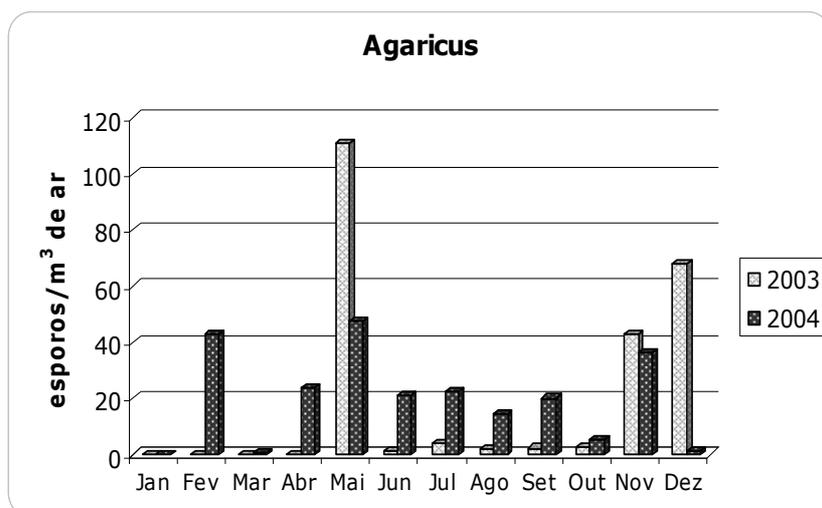


Fig. I 81. Distribuição mensal dos esporos de *Agaricus* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

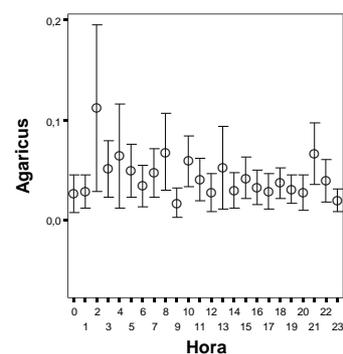


Fig. I 82. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Agaricus* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 33. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Agaricus* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,139**	-0,144**	-0,127**	-0,025	-0,016	-0,135

A análise de correlação sugere a existência de uma correlação negativa, todavia fraca, entre a concentração de esporos de *Agaricus* e a temperatura.

Alternaria* (Nees, 1816)*Família:** Dematiaceae**Ordem:** *Hyphales***Classe:** *Deuteromycetes***Subdivisão:** *Deuteromycotina***Divisão:** *Eumycota***Distribuição:** É um género cosmopolita, especialmente nas regiões temperadas distribuindo-se nos ambientes "indoor" e "outdoor".**Morfologia dos esporos:** Variada, tipicamente elíptica ou ovóide, de aspecto liso ou verrugoso, plurisseptados com septos transversais e longitudinais, coloração castanha. Dimensão variável consoante as espécies: 8-40 X 15-200 µm (ver Lâmina 1. B, pág. 171).**Ecologia/Patogenicidade:** Saprófita dominante de frutos e têxteis, ou fitoparasita de muitas plantas, comum em regiões cultivadas de cereais. É capaz de deteriorar diversos substratos, madeiras e material celulósico em geral. Tem presença generalizada dentro e fora das habitações, encontrando-se frequentemente em armazéns de fruta ou cereais, em solos com raízes e folhas em decomposição.**Alergenicidade:** A sensibilização alérgica ao fungo é comum, especialmente nos climas temperados. Tem uma elevada capacidade de sensibilização das populações desencadeando na maior parte das vezes sintomas pulmonares – asma brônquica, eczema, rinite e rinoconjuntivite. Em geral, despoleta os níveis mais elevados de reactividade em testes cutâneos em indivíduos atópicos expostos ao fungo.**Concentrações totais anuais:** Ocorreu ao longo de todo o ano com uma concentração média de 133 esporos/m³ de ar à excepção de 2002, com 9,18 esporos/m³ de ar, e um total de 277 esporos/m³ de ar no período de estudo.**Concentrações médias mensais:** Os picos de ocorrência surgiram em Maio de 2003 com 36,72 esporos/m³ de ar. Verificou-se um aumento gradual da concentração em 2004 até atingir um pico em Dezembro com 24,3 esporos/m³ de ar (Fig. I 83).

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência incidiram às 10 e às 13 horas, com uma média de 8 e 9 esporos/m³ de ar, respectivamente (Fig. I 84).

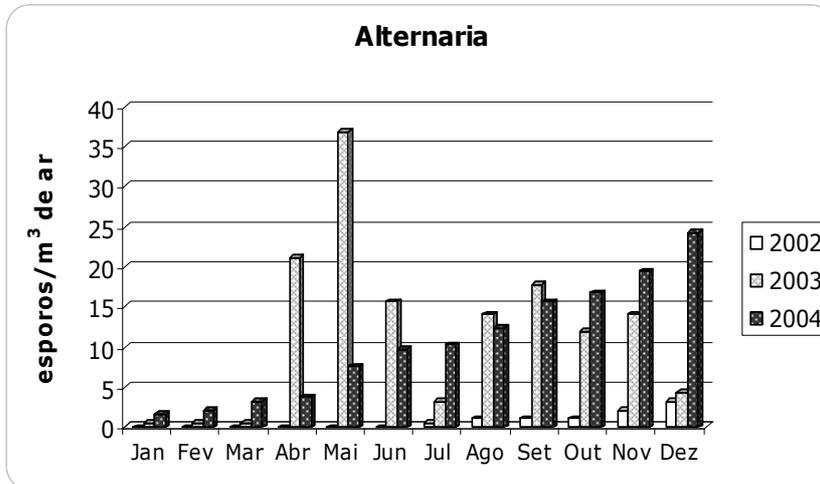


Fig. I 83. Distribuição mensal dos esporos de *Alternaria* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

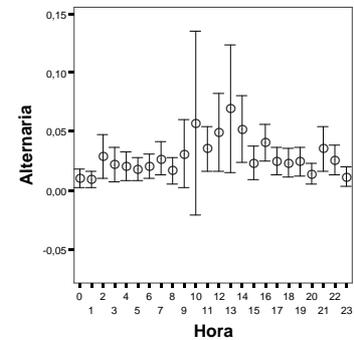


Fig. I 84. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Alternaria* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 34. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Alternaria* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,004	-0,003	0,018	-0,011	-0,024	-0,016

A análise de correlação não demonstra a existência de uma correlação entre a concentração de esporos de *Alternaria* e os parâmetros meteorológicos.

Arthrinium (Kunze 1817)

Família: Dematiaceae

Ordem: *Hyphales*

Classe: *Deuteromycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: Distribuição ampla na natureza, sobretudo nas Regiões temperadas



Morfologia dos esporos: Plurisseptados com septos transversais e longitudinais, coloração castanha (ver Lâmina 1. C, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Ocorre frequentemente em herbáceas, em folhas mortas e no solo, sendo um decompositor de material vegetal.

Alergenicidade: Poderá ter significado clínico, embora não haja referências que o confirmem.

Concentrações totais anuais: Ocorreu com uma concentração média de 13 esporos/m³ de ar/ano, totalizando 37 esporos/m³ de ar no período em estudo. Ocorreu sobretudo no final da Primavera e início do Verão.

Concentrações médias mensais: Os picos de ocorrência surgiram em Maio de 2003, com 8,1 esporos/m³ de ar, e em Dezembro de 2004, com 15,12 esporos/m³ de ar (Fig. I 85).

Concentrações médias horárias: O pico de ocorrência incidiu às 13 horas, com uma média de 5 esporos/m³ de ar (Fig. I 86).

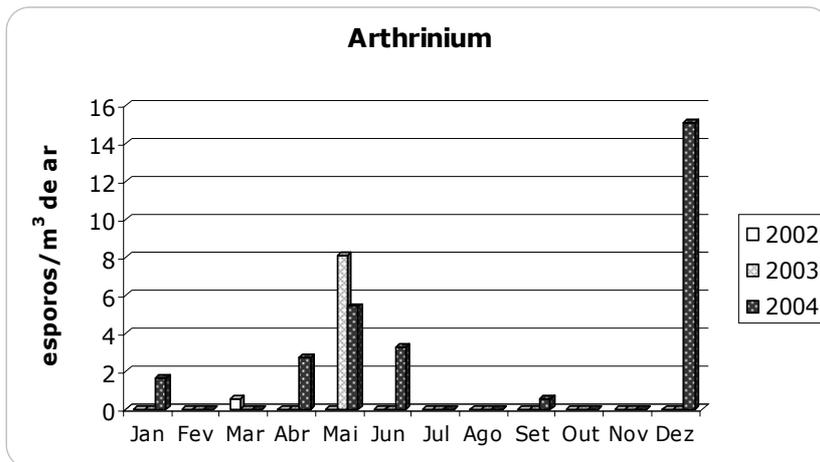


Fig. I 85. Distribuição mensal dos esporos de *Arthriniun* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

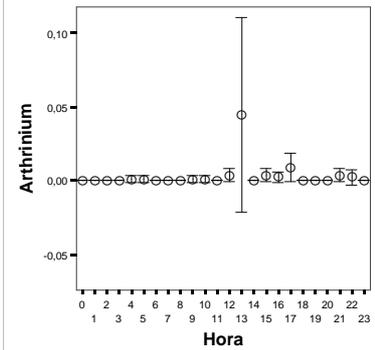


Fig. I 86. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Arthriniun* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 35. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Arthriniun* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,038	-0,015	-0,097*	-0,006	0,007	-0,034

Da análise da correlação de Spearman, a temperatura mínima parece exercer uma acção contrária ao aparecimento deste fungo na atmosfera do Funchal.

Botrytis (P. Micheli ex Pers. 1794)

Família: Dematiaceae

Ordem: *Hyphales*

Classe: *Deuteromycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: De distribuição ampla na natureza, na Europa e América do Norte. Na Europa, os picos de ocorrência máxima do fungo ocorrem sobretudo no final do Verão.



Morfologia dos esporos: Elípticos, ovóides ou subesféricos, de aspecto, contínuo, unicelular, hialinos ou de coloração cinzenta. Dimensões médias: 5-10 X 7-18 μm (ver Lâmina 1. D, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Necessita de água abundante. Resistente ao frio. A maioria das espécies é fitopatogénica de diversos frutos e vegetais.

Alergenicidade: Não se detectam prevalências elevadas de sensibilização em estudos populacionais. Contudo está documentado como alergénico, estando implicado em reacções de hipersensibilidade do tipo I (polinose e asma) e do tipo III.

Concentrações totais anuais: Em 2004 observou-se a maior expressão do género, ocorrendo 63 esporos/ m^3 de ar de um total de 72 esporos/ m^3 de ar obtidos para o período de estudo.

Concentrações médias mensais: O pico de ocorrência surgiu em Maio de 2004, com 23 esporos/ m^3 de ar (Fig. I 87). Ao longo dos 3 anos o género ocorreu sobretudo na Primavera e no Outono de 2004, com a concentração média de 11,34 esporos/ m^3 de ar.

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência surgiram entre as 03 e as 05 horas com um média de 3,2 e 2,1 esporos/ m^3 de ar, respectivamente, e entre as 21 e 23 horas, com um média de 2 esporos/ m^3 de ar (Fig. I 88).

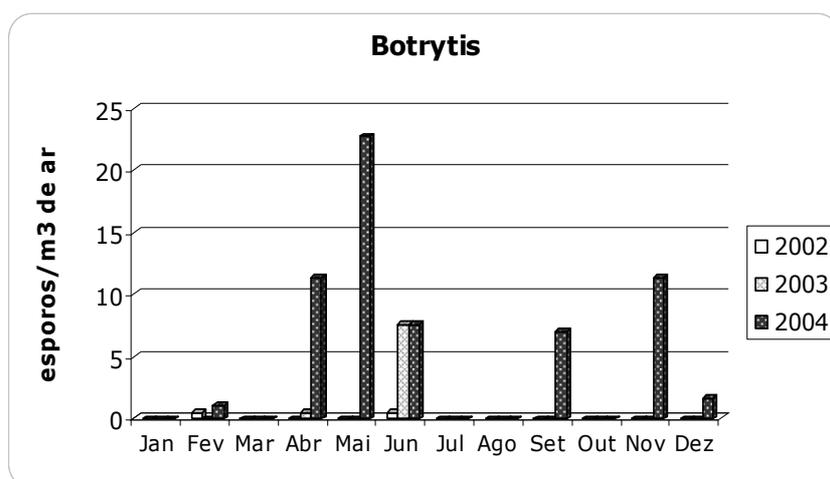


Fig. I 87. Distribuição mensal dos esporos de *Botrytis* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

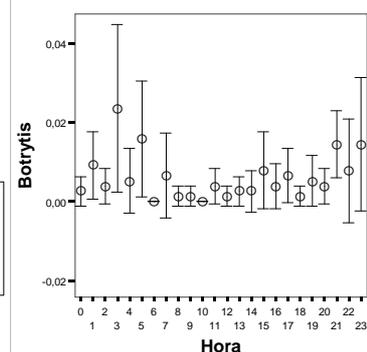


Fig. I 88. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Botrytis* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

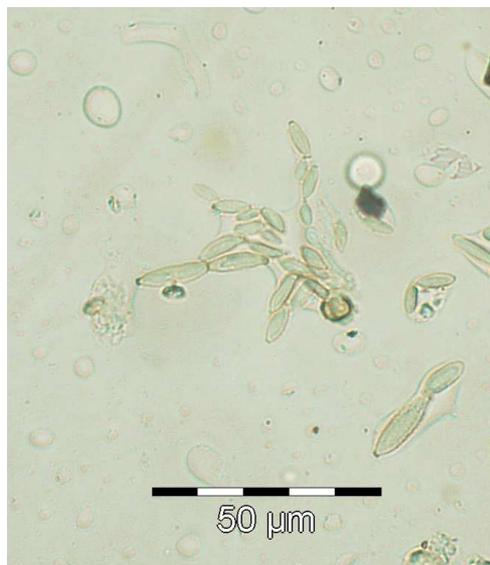
Tabela I 36. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Botrytis* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,120**	-0,107**	-0,123**	-0,010	0,001	-0,037

A análise do coeficiente de Spearman sugere que a ocorrência deste fungo não é favorecida com o aumento da temperatura, nomeadamente a temperatura média e máxima.

Cladosporium* (Link 1816)*Família:** Dematiaceae**Ordem:** *Hyphales***Classe:** *Deuteromycetes***Subdivisão:** *Deuteromycotina***Divisão:** *Eumycota*

Distribuição: *Cladosporium* é um fungo de distribuição ampla, sendo o fungo mais frequente das zonas temperadas, ocorrendo na maioria dos ambientes com predominância de duas espécies: *C. cladosporioides* e *C. herbarum*.



Morfologia dos esporos: Globosos, ovóides, em forma de limão ou cilíndrica, aspecto liso ou ligeiramente verrugoso, com septos transversais, hialinos, coloração verde, castanha ou acinzentada. Dimensões médias: 3-15 X 2-6 µm (ver Lâmina 1. E, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Colonizador de restos animais e vegetais em decomposição, em particular de caules e folhas de um grande número de espécies (fetos, musgos, plantas aquáticas e xerófitas). É frequente no solo, rizosferas, material têxtil, alimentos e superfícies pintadas. O género inclui numerosas espécies parasitas e fitopatogénicas. Necessita de um elevado grau de humidade. Resiste a temperaturas inferiores a 0°C.

Alergenicidade: Alergénico. Tem a particularidade de esporular em grandes quantidades e de dispersar com facilidade na atmosfera, tornando-o num agente alergénico importante. A sensibilização a *Cladosporium* está correlacionado com o diagnóstico clínico de asma, eczema e rinite.

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano, totalizando 5580 esporos/m³ de ar, durante o período em estudo. Em 2003 registaram-se as concentrações mais elevadas: 3686 esporos/m³ de ar, e em 2004 1440 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: Em 2003 registaram-se as concentrações mais elevadas, sobretudo entre os meses de Abril e Outubro, com uma concentração média de

460 esporos/m³ de ar (Fig. I 89). Em 2002 e 2004 as maiores ocorrências incidiram no final da Primavera e Outono, com uma concentração média de 270 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência surgiram às 14 horas, com uma média de 149 esporos/m³ de ar, diminuindo até os 30 esporos/m³ de ar às 18 horas, vindo a aumentar a partir das 10 horas (Fig. I 90).

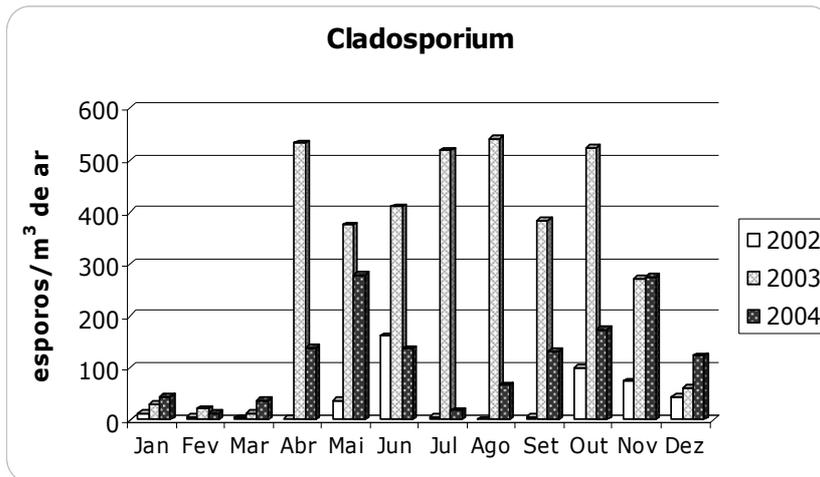


Fig. I 89. Distribuição mensal dos esporos de *Cladosporium* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

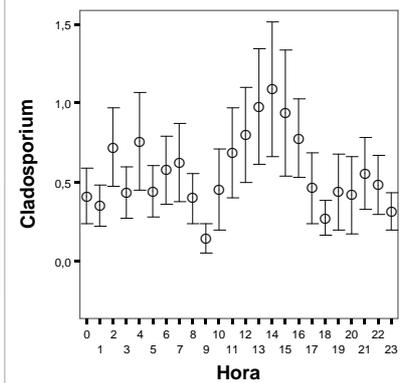


Fig. I 90. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Cladosporium* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 37. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Cladosporium* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,213**	0,184**	0,194**	0,104**	-0,015	-0,059

Verifica-se uma correlação significativa de sinal positivo entre a temperatura e a concentração do fungo, e uma correlação positiva fraca com a humidade relativa.

Coprinus* (Pers. 1797)*Família:** Coprinaceae**Ordem:** *Agaricales***Classe:** *Basidiomycetes***Subdivisão:** *Basidiomycotina***Divisão:** *Eumycota*

Distribuição: Regiões temperadas do Hemisfério Norte. O género é comum e amplamente distribuído em relvados e jardins. Estes últimos são normalmente locais de exposição de basidiosporos.



Morfologia dos esporos: Elípticos, de aspecto liso, coloração castanho escuro. Dimensões médias: 7-18 X 4,5-12 μm (ver Lâmina 1. F, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Ocorrem na matéria em decomposição. Podem ser encontrados em madeiras e em gramíneas.

Alergenicidade: Considerado um alergénio importante, com implicações nos ataques de asma. Estudos com *Coprinus comatus* indicam que os seus alergénios podem agravar lesões de eczemas da pele em indivíduos com dermatite atópica. Foi observado em pacientes atópicos reacção positiva nos testes cutâneos em *Prick* com extractos de esporos de *Coprinus micaceous*.

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano, totalizando 730 esporos/ m^3 de ar em período de estudo.

Concentrações médias mensais: Os picos de ocorrência surgiram entre Abril e Junho em 2003 e 2004, observando-se valores máximos em igual período de 2003 com 125 esporos/ m^3 de ar. As concentrações aumentaram no final do Outono e início de Inverno com uma concentração média de 46 esporos/ m^3 de ar (Fig. I 91).

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência surgiram sobretudo de madrugada, atingindo um pico às 5 horas, com uma média de 20 esporos/ m^3 de ar,

diminuindo até os 3 esporos/m³ de ar às 13 horas, vindo a aumentar progressivamente até o início da noite (Fig. I 92).

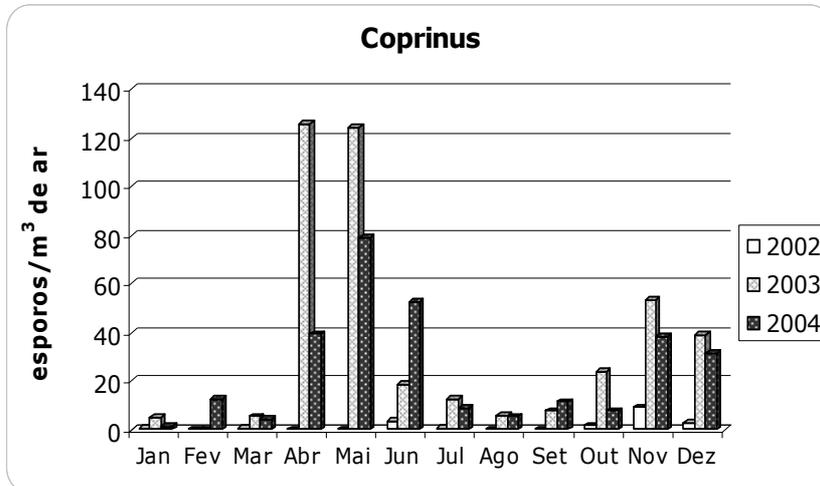


Fig. I 91. Distribuição mensal dos esporos de *Coprinus* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

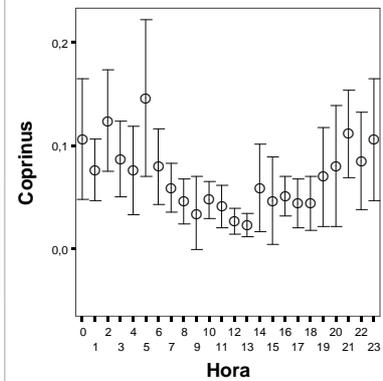


Fig. I 92. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Coprinus* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 38. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Coprinus* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,114**	-0,160**	-0,192**	0,026	0	0,212**

Verifica-se uma correlação de sinal negativo para o parâmetro temperatura, e uma correlação positiva, embora fraca, para o vento do quadrante Norte-Noroeste.

***Curvularia* (Boedijn 1933)**

Família: Dematiaceae

Ordem: *Hyphales*

Classe: *Deuteromycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: Fungo cosmopolita de ampla distribuição. Ocorre sobretudo em regiões tropicais e subtropicais.



Morfologia dos esporos: Falciformes, plurisseptados com septos transversais, coloração castanha (ver Lâmina 1. G, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Fitoparasita. A maioria das espécies de *Curvularia* são patogênicas facultativas do solo, nas áreas tropicais ou subtropicais, enquanto outras ocorrem somente em zonas temperadas. Ocorrem em diversas espécies de plantas, nomeadamente gramíneas.

Alergenicidade: Reconhecido como aeroalergénio importante por ser causador de sinusite alérgica fúngica, estando implicado nas reacções de hipersensibilidade do tipo I (polinose e asma). *Curvularia* pode causar doenças alérgicas do foro respiratório, nomeadamente broncopulmonares e provocar reactividades cutâneas elevadas. Foi comprovada a sua responsabilidade nos quadros clínicos da aspergilose broncopulmonar alérgica, juntamente com *Dreschlera* e *Stemphylium*.

Concentrações totais anuais: Ocorreu sobretudo em 2003 com 27 esporos/m³ de ar, observando-se somente uma ocorrência em Janeiro de 2002, e 1,62 esporos/m³ de Setembro a Dezembro de 2004.

Concentrações médias mensais: As concentrações foram em média muito baixas, situando-se entre os 2 e 3 esporos/m³ de Abril a Dezembro, registando-se um pico de ocorrência em Agosto de 2003, com 15 esporos/m³ de ar (Fig. I 93).

Concentrações médias horárias: Registou-se um pico de ocorrência às 15 horas com uma média de 2,8 esporos/m³ de ar (Fig. I 94).

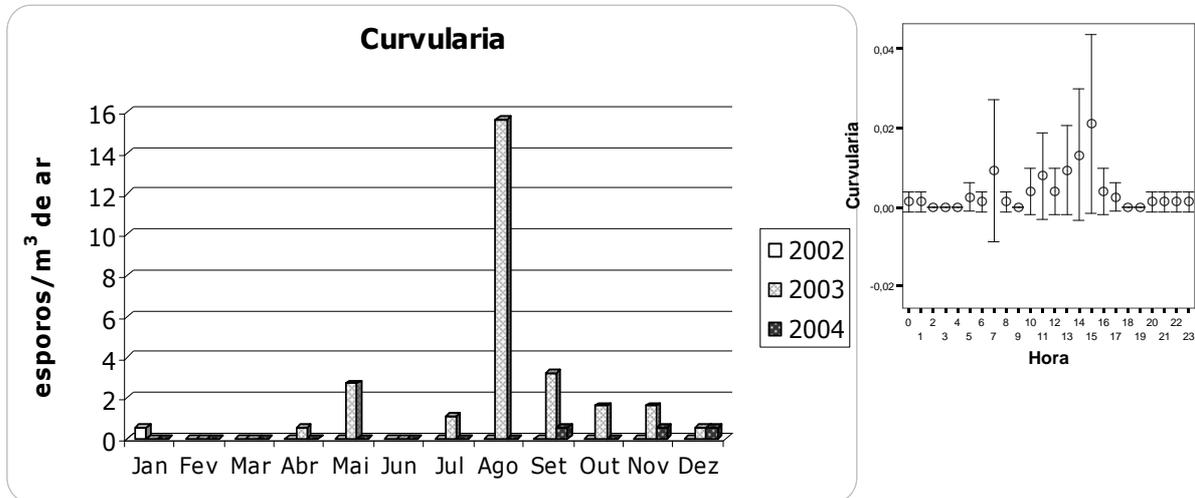


Fig. I 93. Distribuição mensal dos esporos de *Curvularia* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

Fig. I 94. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Curvularia* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 39. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Curvularia* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,136**	0,138**	0,097**	-0,027	-0,025	-0,031

Obtiveram-se correlações positivas significativas com a temperatura, e correlações de sinal negativo, com a direcção do vento. Constata-se que o vento direccionado de todo o quadrante Este favorece a incidência deste fungo.

Drechslera* (S. Ito. 1930)*Família:** Dematiaceae**Ordem:** *Hyphales***Classe:** *Deuteromycetes***Subdivisão:** *Deuteromycotina***Divisão:** *Eumycota***Distribuição:** Género de distribuição ampla. Ocorre em regiões temperadas da Europa**Morfologia dos esporos:** Forma variada, alantóide, aspecto liso, plurisseptados com pseudo-septos transversais, coloração verde, castanha claro ou escura. Dimensão muito variável entre as espécies: 5-30 X 12-250 µm (ver Lâmina 1. H, pág. 171).**Ecologia/Patogenicidade:** Geralmente saprofítico ou parasita de diversas plantas, especialmente de gramíneas. Ocorre sobretudo em relvados e áreas de cultivo.**Alergenicidade:** Foram documentadas reacções positivas elevadas nos testes cutâneos em indivíduos atópicos. Foram identificados casos de alergia broncopulmonar provocadas por *Drechslera hawaiiensis*. Outro trabalho que decorreu no *Anderson Cancer Center* descreveu este género como um dos agentes etiológicos de 16 casos de sinusite alérgica fúngica numa população de pacientes entre os 8 e os 71 anos, média de 25 anos.**Concentrações totais anuais:** Ocorreu ao longo de todo o ano, totalizando 117 esporos/m³ de ar. Em 2002 registou-se uma ocorrência, enquanto que em 2003 contabilizaram-se 87 esporos/m³ de ar.**Concentrações médias mensais:** Os picos de ocorrência surgiram entre Abril e Junho em 2003 e 2004, observando-se um pico absoluto de 24,30 esporos/m³ de ar em Maio de 2003. Em igual período de 2004, ocorreu novo pico de 7,56 esporos/m³ de ar (Fig. I 95).

Concentrações médias horárias: Entre 0,5 e 1,5 esporos/ m³ de ar ao longo do dia, atingindo picos entre as 12 e as 14 horas, com uma média de 3,2 esporos/m³ de ar (Fig. I 96).

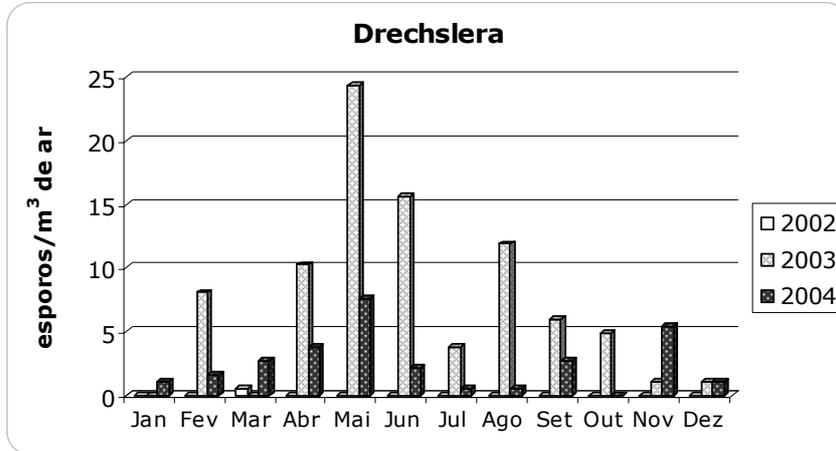


Fig. I 95. Distribuição mensal dos esporos de *Drechslera* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

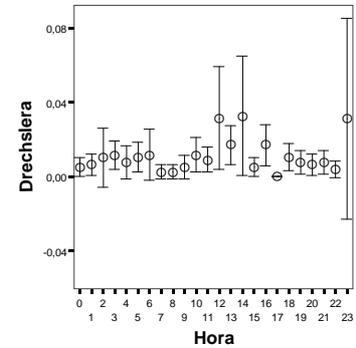


Fig. I 96. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Drechslera* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 40. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias de *Drechslera* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,033	0,026	0,023	0,015	-0,032	0,026

A análise de correlação de Spearman não demonstra a existência de uma correlação entre a concentração de esporos de *Drechslera* e os parâmetros meteorológicos.

***Epicoccum* (Link 1815)**

Família: Tuberculariaceae

Ordem: *Hyphales*

Classe: *Deuteromycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: O género é de distribuição ampla, sobretudo em regiões temperadas, ocorrendo em áreas cultivadas e não cultivadas.



Morfologia dos esporos: Globosos, subesféricos ou piriformes, plurisseptados com septos transversais e longitudinais, coloração castanha. Dimensões médias: 15-25 µm em diâmetro (ver Lâmina 1. I, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Cosmopolita, frequente nas amostras de ar e habitualmente isolado do solo e de géneros alimentícios. É um agente secundário de decomposição de plantas, animais, solos, papel e têxteis. É um dos agentes causadores de manchas nas folhas de várias plantas.

Alergenicidade: Algumas espécies produzem esporos altamente alergénicos, atingindo o seu pico no início do Outono. Os estudos realizados sobre este fungo indicaram valores de *SPTs* e de *RAST* entre 20 e 30% de reactividade em indivíduos atópicos. Pode despoletar reactividades cutâneas elevadas, partilhando alergenicidade com diferentes fungos responsáveis pela sintomologia alérgica do tipo I. Vários estudos demonstraram a sensibilização a *Epicoccum purpurascens* na ordem dos 5 a 7% em diferentes populações em todo o mundo.

Concentrações totais anuais: Ocorreu a partir de 2003 com 8,1 esporos/m³ de ar, atingindo em 2004 22 esporos/m³ de ar de um total de 31,32 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: Ocorreu ao longo de todo o ano, à excepção de Fevereiro e Julho. Em 2003 os picos de ocorrência situaram-se entre os 2,16 esporos/m³ de ar nos meses de Maio, Agosto e Setembro, atingindo 4,86 esporos/m³ de ar em Junho de 2004 (Fig. I 97).

Concentrações médias horárias: Observaram-se dois picos de ocorrência às 12 e as 14 horas, com uma média de 1,3 e 1,6 esporos/m³ de ar, respectivamente (Fig. I 98). Não se registaram ocorrências entre as 19 e as 20 horas, bem como no início da madrugada.

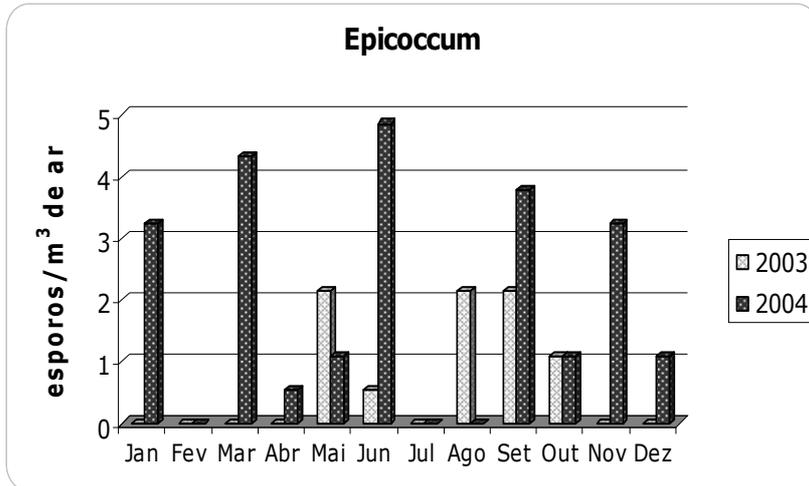


Fig. I 97. Distribuição mensal dos esporos de *Epicoccum* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

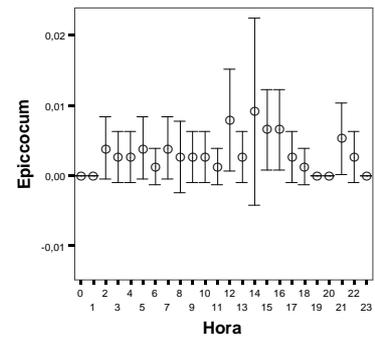


Fig. I 98. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Epicoccum* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 41. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Epicoccum* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,273*	0,181*	0,174*	-0,003	-0,036	-0,322

A análise de correlação sugere uma influência positiva da temperatura e do vento direccionado de todo o quadrante Este na incidência deste fungo.

***Fusarium* (Link 1809)**

Família: Tuberculariaceae

Ordem: *Hyphales*

Classe: *Deuteromycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: A maioria das espécies ocorre nas áreas tropicais e subtropicais bem como em regiões temperadas e húmidas.



Morfologia dos esporos: Filiformes, septados com septos transversais, coloração verde, cinzenta, ou hialina. Dimensões médias: 40 µm (1, 10) (ver Lâmina 1. J, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: *Fusarium* é um fungo amplamente distribuído nas plantas e no solo, em organismos em decomposição, necessitando de água abundante e ocorrendo sobretudo em áreas agrícolas. Fitopatogénio comum, parasitando diversas espécies de plantas. A dispersão das partículas fúngicas pode ser favorecida pelo tempo húmido e quente bem como pela pluviosidade.

Alergenicidade: Alergénio comum, implicado nas reacções cutâneas significativas, reacções de hipersensibilidade do tipo I (polinose e asma), micetomas e queratites. As espécies deste género são agentes comuns causadores de infecções superficiais e sistémicas em humanos. As infecções causadas por *Fusarium* são geralmente denominadas por fusarioses, sendo igualmente conhecidos como agentes causadores de asma brônquica.

Concentrações totais anuais: Observaram-se as maiores ocorrências em 2004, com 234 esporos/m³ de ar num total de 282 esporos/m³ de ar ao longo do período de estudo. Em 2002 registou-se um total de 6,48 esporos/m³ de ar e em 2003, 41 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: A ocorrência deste género incidiu sobretudo nos meses de Abril a Julho e entre Outubro e Dezembro. Atingiu um pico de concentração de 40 esporos/m³ de ar em Maio de 2004 e um outro em Novembro do mesmo ano, com 46 esporos/m³ de ar (Fig. I 99).

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência surgiram sobretudo de manhã, atingindo os valores máximos às 6 horas com uma média de 12 esporos/m³ de ar, e as concentrações mais baixas pelas 15 horas (Fig. I 100).

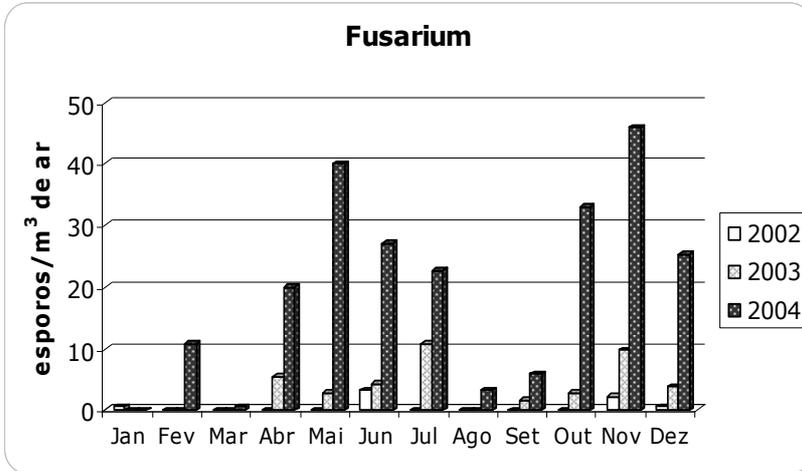


Fig. I 99. Distribuição mensal dos esporos de *Fusarium* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

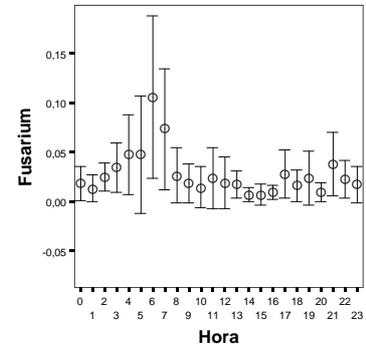


Fig. I 100. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Fusarium* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 42. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Fusarium* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,166*	-0,059	-0,167*	0,041	0,018	0,121**

Observa-se uma correlação negativa entre a ocorrência do fungo e a temperatura média, e uma correlação positiva com o vento do quadrante Este.

Ganoderma* (P. Karst. 1881)*Família:** Polyporaceae**Ordem:** *Polyporales***Classe:** *Basidiomycetes***Subdivisão:** *Basidiomycotina***Divisão:** *Eumycota***Distribuição:** Cosmopolita, de distribuição ampla.

Morfologia dos esporos: Ovóides, unisseptados coloração amarelo-acastanhada. Possuem uma parede externa lisa e transparente e a parede interna castanho-dourada. Outros atributos distintivos são as conexões da parede intermédia e um poro germinativo proeminente com um ápice truncado (ver Lâmina 1. K, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Comum em madeiras, hospedeiro de algumas espécies de plantas. Cresce em árvores tais como, castanheiros, aveleiras e coníferas, como por exemplo, o pinheiro. Ocorre igualmente em árvores em decomposição.

Alergenicidade: Considerado um aeroalergénio importante com implicações nos ataques de asma. Foi observado em alguns pacientes atópicos reacção positiva em testes cutâneos com extractos de esporos de *Ganoderma*.

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano registando-se em 2003 as concentrações mais elevadas, 520 esporos/m³ de ar num total de 782 esporos/m³ de ar no período em estudo.

Concentrações médias mensais: Os picos de ocorrência incidiram em Maio e nos meses de Verão. Em Setembro de 2003 registou-se um pico máximo de ocorrência de 157 esporos/m³ de ar. O pico de ocorrência atingido em 2004 foi observado em Outubro, com 54 esporos/m³ de ar (Fig. I 101).

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência surgiram sobretudo de madrugada e manhã, atingindo um pico às 2 horas, seguindo-se um outro às 7 horas com

18 esporos/m³ de ar em média. Os valores mínimos registaram-se entre as 19 e 20 horas, com 4 esporos/m³ de ar (Fig. I 102).

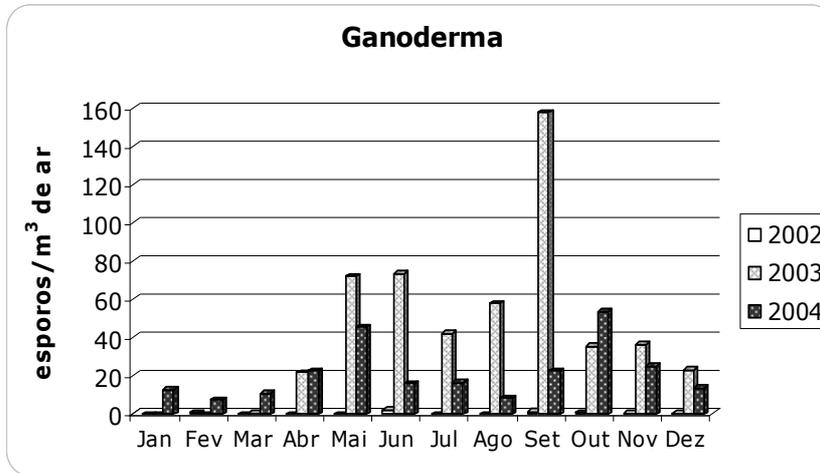


Fig. I 101. Distribuição mensal dos esporos de *Ganoderma* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

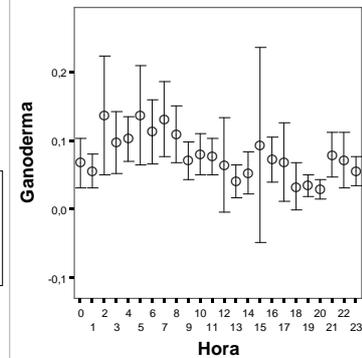


Fig. I 102. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Ganoderma* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 43. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Ganoderma* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,169**	0,162**	0,161**	0,043	-0,054	-0,053

Verifica-se uma correlação significativa de sinal positivo entre a ocorrência do fungo e a temperatura.

Gliomastix* (Guég. 1905)*Família:** Dematiaceae**Ordem:** *Hyphales***Classe:** *Deuteromycetes***Subdivisão:** *Deuteromycotina***Divisão:** *Eumycota***Distribuição:** O género é de distribuição ampla.**Morfologia dos esporos:** Ovóides, contínuos (não septados), de aspecto papilado, coloração amarelo-acastanhada (ver Lâmina 1. L, pág. 171).**Ecologia/Patogenicidade:** Comum no ar, no solo, em sementes, madeiras e herbáceas em decomposição (sobretudo caules), pois tem preferências por materiais celulósicos.**Alergenicidade:** A sua alergenicidade ainda não foi determinada. No entanto, este esporo de fungo foi detectado em pacientes com rino-sinusite crónica.**Concentrações totais anuais:** Ocorreu a partir de 2003 com um total de 7,02 esporos/m³ de ar, vindo a aumentar para os 25 esporos/m³ de ar em 2004.**Concentrações médias mensais:** Em 2003 ocorreu em Abril e Dezembro, altura em que atingiu o máximo de 5,94 esporos/m³ de ar. Em 2004 ocorreu ao longo de todo ano, atingindo o valor máximo de 5,40 esporos/m³ de ar no mês de Julho (Fig. I 103).**Concentrações médias horárias:** O género atingiu um pico absoluto de concentração de 2,7 esporos/m³ de ar às 10 horas, não se observando registos entre as 14 e as 15 horas, bem como entre as 19 e as 20 horas (Fig. I 104).

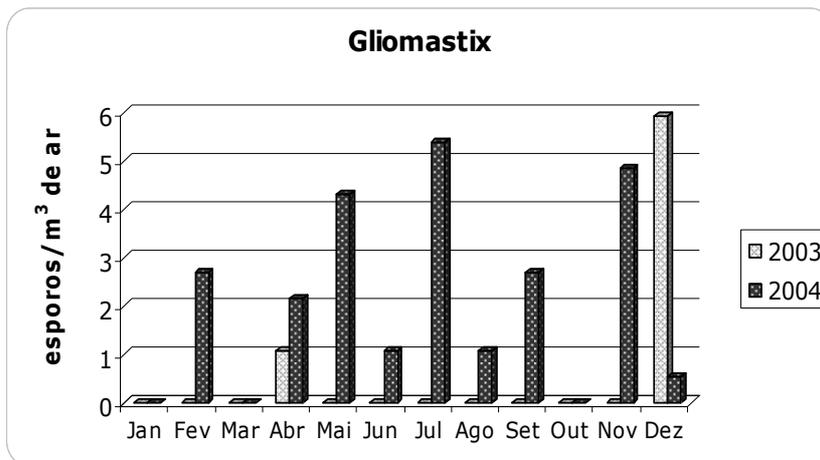


Fig. I 103. Distribuição mensal dos esporos de *Gliomastix* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

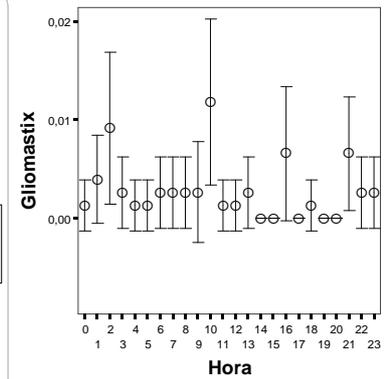


Fig. I 104. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Gliomastix* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 44. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Gliomastix* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,084*	-0,090**	-0,084*	-0,015	0,056	-0,053

A análise do coeficiente de Spearman sugere a existência de uma correlação fraca de sinal negativo com a temperatura.

Leptosphaeria* (Ces. & De Not. 1863)*Família:** Pleosporales**Ordem:** *Pleosporales***Classe:** *Ascomycetes***Subdivisão:** *Ascomycotina***Divisão:** *Eumycota*

Distribuição: A maioria das espécies ocorre nas áreas tropicais e subtropicais. Ocorre na Europa e Regiões temperadas da América do Norte.

Morfologia dos esporos: Falciformes, plurisseptados, com septos transversais, coloração castanha (ver Lâmina 1. M, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Ocorre no solo, sementes e caules vegetais vivos ou em decomposição. Coloniza diversas plantas, particularmente gramíneas. Cresce saprofiticamente e como patogénio vegetal.

Alergenicidade: Foi demonstrada reactividade cutânea a extractos de esporos deste fungo. *Leptosphaeria* pode ser um agente causador de infecções no humano.

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano registando-se em 2003 as concentrações mais elevadas, 857 esporos/m³ de ar de um total de 1136 esporos/m³ de ar no período de estudo.

Concentrações médias mensais: Em Abril de 2003 registou-se o pico absoluto de concentração de 439 esporos/m³ de ar. Em 2004 registou-se um pico de ocorrência em Agosto com 73 esporos/m³ de ar (Fig. I 105).

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência surgiram sobretudo de madrugada, atingindo um pico às 4 horas com uma média de 33 esporos/m³ de ar, e depois às 19 horas, com 27 esporos/m³ de ar (Fig. I 106).



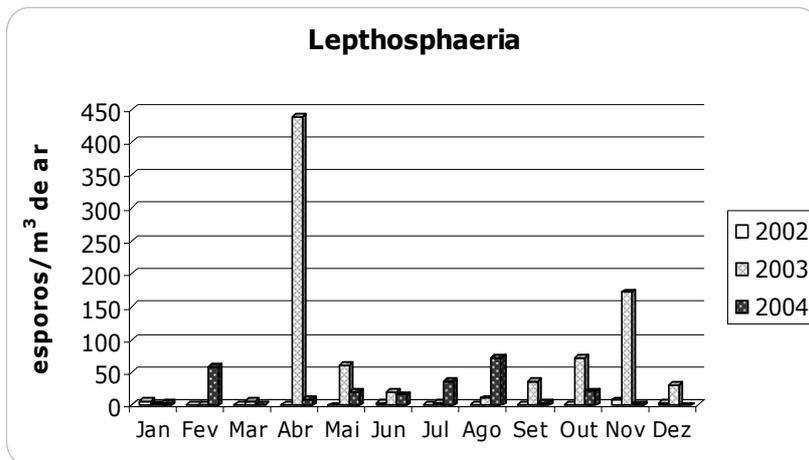


Fig. I 105. Distribuição mensal dos esporos de *Leptosphaeria* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

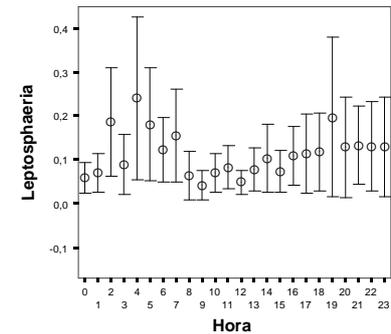


Fig. I 106. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Leptosphaeria* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 45. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Leptosphaeria* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,009	-0,039	-0,011	0,125**	0,008	0,120**

No período de estudo obtiveram-se correlações positivas entre o fungo, a humidade e o vento direccionado do quadrante Norte-Noroeste.

***Lophiostoma* (Ces & De Not. 1863)**

Família: Lophiostomataceae

Ordem: Pleosporales

Classe: Ascomycetes

Subdivisão: Ascomycotina

Divisão: Eumycota

Distribuição: Cosmopolita, Regiões temperadas da Europa, América do Norte e Ártico.



Morfologia dos esporos: Falciformes, unisseptados, coloração castanha (ver Lâmina 1. N, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: Ocorre em folhas mortas. Coloniza uma ampla variedade de plantas, nomeadamente de Rosáceas (p.ex: pereira e macieira).

Alergenicidade: A capacidade de provocar patologia alérgica no homem é muito pouco conhecida. Uma das razões poderá ser a falta de extratos padronizados para a determinação de sensibilização a este fungo.

Concentrações totais anuais: Registaram-se ocorrências em 2004, com um total de 15,66 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: O género foi observado em Fevereiro, Julho, Agosto e Outubro. O pico de concentração foi observado em Julho, 7,02 esporos/m³, e o mais baixo em Outubro, com 1,08 esporos/m³ de ar (Fig. I 107).

Concentrações médias horárias: Os picos de concentração incidem entre as 21 e 22 horas, embora houvesse registos intermitentes ao longo do dia (Fig. I 108).

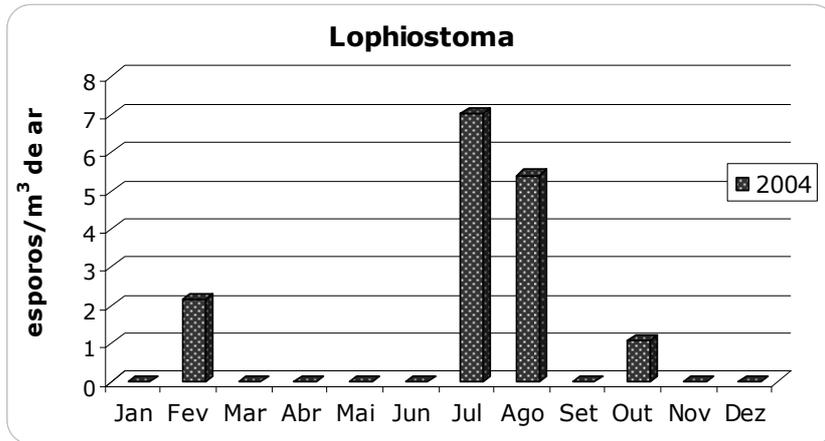


Fig. I 107. Distribuição mensal dos esporos de *Lophiostoma* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

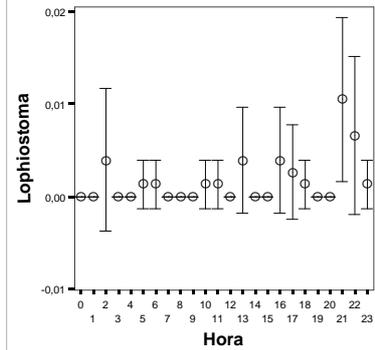


Fig. I 108. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Lophiostoma* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 46. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Lophiostoma* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

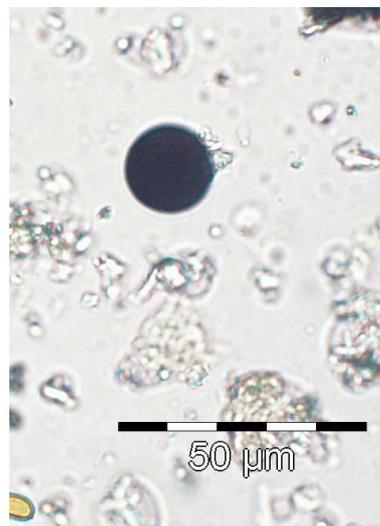
	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,023	0,022	0,046	-0,044	0,057	-0,068*

Observou-se uma correlação negativa fraca entre a ocorrência do fungo e o vento dominante do quadrante Este.

***Nigrospora* (Zimm. 1902)**

Família: Dematiaceae
Ordem: *Hyphales*
Classe: *Deuteromycetes*
Subdivisão: *Deuteromycotina*
Divisão: *Eumycota*

Distribuição: Ocorre sobretudo em regiões tropicais e subtropicais.



Morfologia dos esporos: Globosos, contínuos e de coloração negra (ver Lâmina 1. O, pág. 171).

Ecologia/Patogenicidade: *Nigrospora* é um fungo amplamente distribuído no solo, plantas em decomposição e sementes. É saprofítico ou em parte parasita de uma vasta gama de hospedeiros vegetais.

Alergenicidade: Considerado alergénico. Implicado em manifestações de hipersensibilidade do tipo I (polinose e asma).

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano, registando-se em 2004 as concentrações mais elevadas, 54 esporos/m³ de ar num total de 97 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: Ocorreu sobretudo na Primavera e no Verão, surgindo em Setembro de 2004 o valor máximo de 15,2 esporos/m³ de ar, seguido de 9,20 e 2,16 esporos/m³ de ar em 2003 e 2002 respectivamente (Fig. I 109).

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência surgem entre as 11 e 16 horas, com a média de 2,5 esporos/m³ de ar (Fig. I 110).

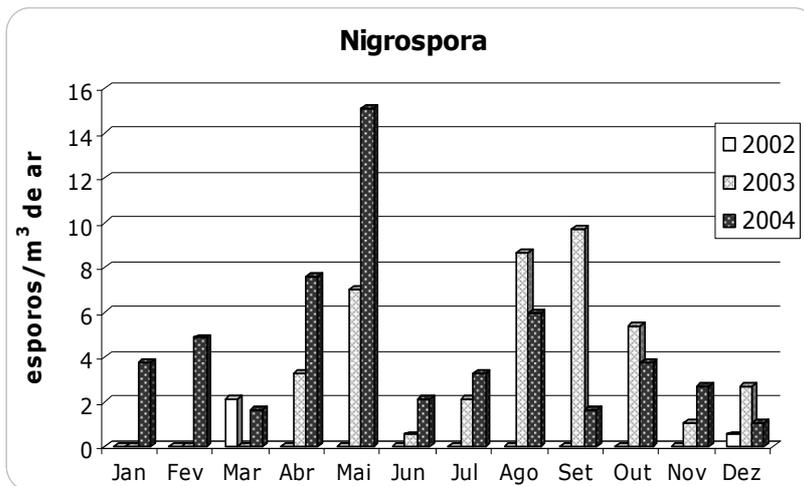


Fig. I 109. Distribuição mensal dos esporos de *Nigrospora* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

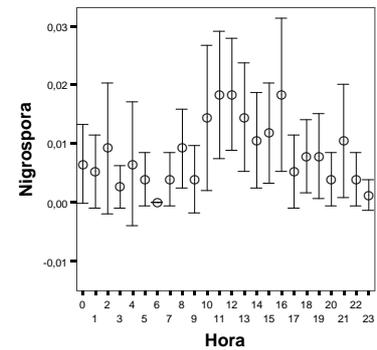


Fig. I 110. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Nigrospora* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 47. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Nigrospora* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,094**	0,108**	0,082*	-0,04	-0,023	-0,001

Este fungo apresentou uma correlação positiva, embora fraca, com a temperatura.

***Periconia* (Tode 1791)**

Família: Dematiaceae

Ordem: *Hyphales (Moniliales)*

Classe: *Deuteromycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: Cosmopolita



Morfologia dos esporos: Globosos, verrucoso ou equinado, coloração castanha. Dimensões médias: 10 X 16 μm de diâmetro (ver Lâmina 2. P, pág. 172).

Ecologia/Patogenicidade: Amplamente distribuído em vários substratos, incluindo caules de gramíneas, folhas em decomposição e no solo. É saprófito e parasita de uma vasta gama de hospedeiros vegetais.

Alergenicidade: Os efeitos na saúde humana ainda não foram investigados.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2002, com 0,54 esporos/ m^3 de ar, e em 2004, totalizando 14,58 esporos/ m^3 de ar.

Concentrações médias mensais: Destaca-se um pico de ocorrência em Maio de 2004, com 7,02 esporos/ m^3 de ar (Fig. I 111).

Concentrações médias horárias: Ocorreu ao longo de todo o dia embora, surgisse um pico às 14 horas, com uma média de 1,62 esporos/ m^3 de ar (Fig. I 112).

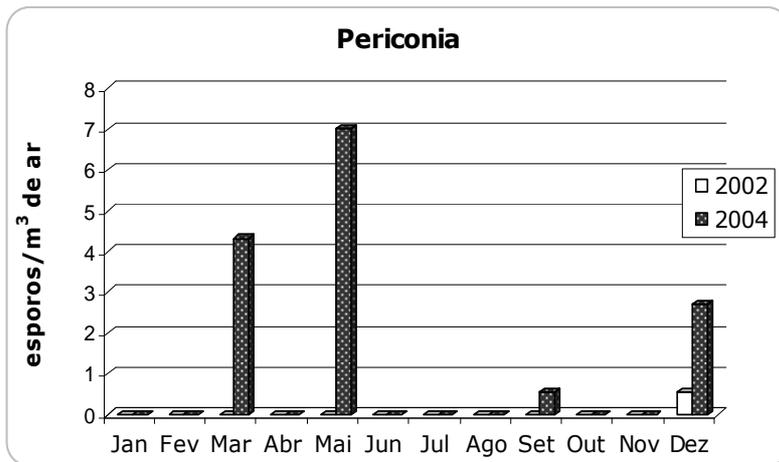


Fig. I 111. Distribuição mensal dos esporos de *Periconia* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

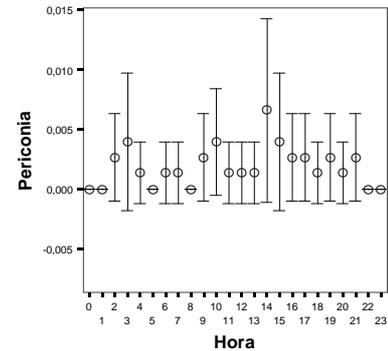


Fig. I 112. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Periconia* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 48. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Periconia* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,011	-0,015	-0,004	0,041	0,016	-0,064

Da análise de correlação não se constata a influência clara dos parâmetros meteorológicos na concentração deste fungo.

***Pleospora* (Rabenh. Ex Ces & De Not 1863)**

Família: Pleosporaceae

Ordem: *Pleosporales*

Classe: *Ascomycetes*

Subdivisão: *Ascomycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: O género é de distribuição ampla. Ocorre na Europa e América do Norte.



Morfologia dos esporos: Forma cilíndrica, plurisseptado com septos transversais e longitudinais, coloração castanha (ver Lâmina 2. Q, pág. 172).

Ecologia/Patogenicidade: Coloniza uma vasta gama de plantas, ocorrendo em diversas plantas herbáceas, em folhas, raízes e sementes.

Alergenicidade: Fungo com potencial alergénico.

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano, registando-se as concentrações mais elevadas em 2003, com 93 esporos/m³ de ar de um total de 150 esporos/m³ de ar em todo o período de estudo.

Concentrações médias mensais: Os picos de ocorrência surgiram em Maio de 2003 e Novembro de 2004. Em ambos os anos atingiram-se valores máximos de 20,52 e de 17,82 esporos/m³ de ar, respectivamente (Fig. I 113).

Concentrações médias horárias: O género atingiu um pico destacado de concentração máxima às 15 horas, seguindo ao longo do dia uma concentração média horária de 2 esporos/m³ de ar (Fig. I 114).

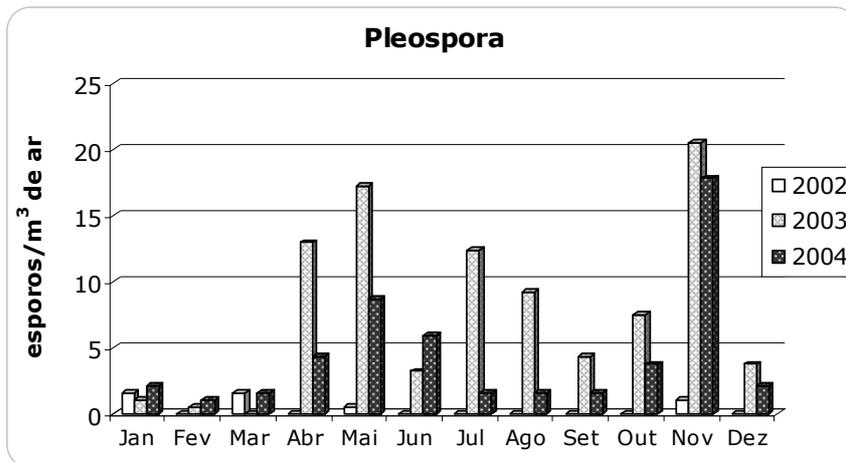


Fig. I 113. Distribuição mensal dos esporos de *Pleospora* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

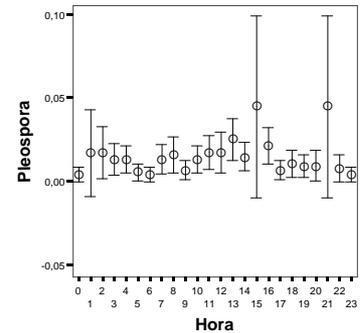


Fig. I 114. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Pleospora* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 49. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Pleospora* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,019	-0,01	-0,019	0,004	-0,025	-0,005

Da análise de correlação não se constata a influência clara dos parâmetros meteorológicos na concentração deste fungo.

Polythrincium* (Kunze 1817)*Família:** Dematiaceae**Ordem:** *Hyphales***Classe:** *Deuteromycetes***Subdivisão:** *Deuteromycotina***Divisão:** *Eumycota***Distribuição:** O género é de distribuição ampla. Frequente nas regiões temperadas.**Morfologia dos esporos:** Tipicamente de forma cónica ou piriforme, contendo um septo transversal que divide equivalentemente duas células. De aspecto liso ou verrugoso, hialino ou coloração verde-cinzenta. Dimensões médias: 13-24 µm largura máxima; 4-5 µm na base; 17-24 µm comprimento (ver Lâmina 2. R, pág. 172).**Ecologia/Patogenicidade:** Ocorre normalmente em folhas. Parasita comum em espécies do género *Trifolium*.**Alergenicidade:** Considerado um alérgeno importante.**Concentrações totais anuais:** Ocorreu em 2003 e 2004, com concentrações totais de 21,06 e 2,7 esporos/m³ de ar, respectivamente.**Concentrações médias mensais:** O género ocorreu entre os meses de Abril e Junho e de Setembro a Dezembro. O pico de concentração média mais elevado foi registado em Maio de 2003, com 18 esporos/m³ de ar (Fig. I 115).**Concentrações médias horárias:** O género não apresenta um padrão horário regular, embora surja de preferência durante a madrugada, entre a 1 e as 4 horas, ocorrendo de forma intermitente ao longo do dia, com uma concentração média a variar entre os 0,25 e os 0,30 esporos/m³ de ar (Fig. I 116).

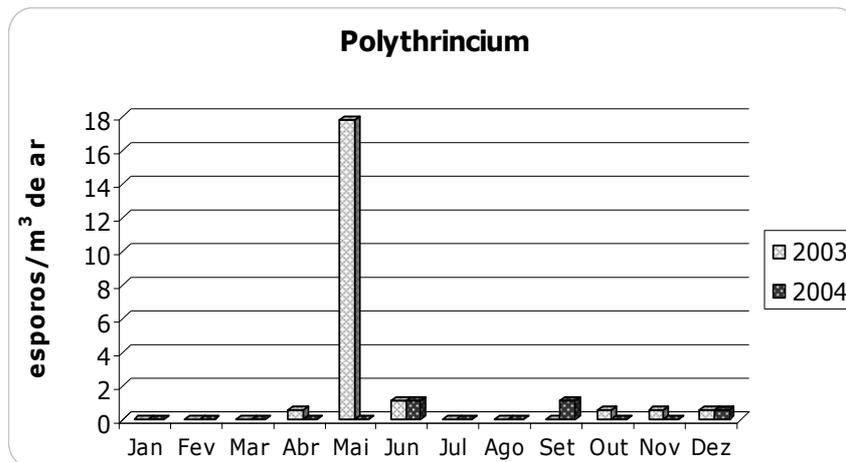


Fig. I 115. Distribuição mensal dos esporos de *Polythrincium* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

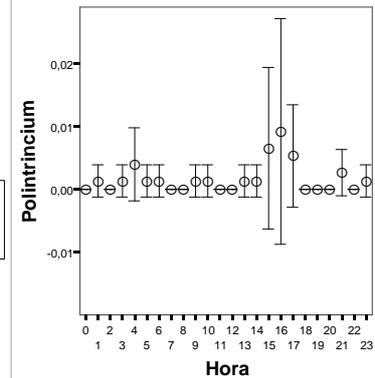


Fig. I 116. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Polythrincium* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 50. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Polythrincium* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,011	-0,007	-0,024	0,002	-0,016	0,008

A concentração deste fungo não apresenta correlação com nenhum dos parâmetros meteorológicos.

Puccinia* (Pers. 1801)*Família:** Pucciniaceae**Ordem:** *Uredinales***Classe:** *Basidiomycetes***Subdivisão:** *Basidiomycota***Divisão:** *Eumycota***Distribuição:** Fungo de distribuição ampla.**Morfologia dos esporos:** Fusiformes, septados coloração castanha. Dimensões médias: 28 X 40 µm (ver Lâmina 2. S, pág. 172).**Ecologia/Patogenicidade:** São designados de uma forma genérica por ferrugens, tendo sido descritos várias associações de espécies de ferrugem-hospedeiros para a Ilha da Madeira e Macaronésia. Parasitas de diversas plantas, vivendo sobretudo em gramíneas, sementes e diversas espécies hortícolas.**Alergenicidade:** Pode constituir uma causa importante no aparecimento de alergia. Foram documentados casos pontuais de reacções de hipersensibilidade do tipo I.**Concentrações totais anuais:** Ocorreu ao longo de todo o ano registando-se em 2003 as concentrações mais elevadas, 306 esporos/m³ de ar de um total de 369 esporos/m³ de ar no período de estudo.**Concentrações médias mensais:** Os picos de ocorrência surgiram entre Abril e Agosto de 2003, observando-se neste último o valor máximo de 56 esporos/m³ de ar (Fig. I 117).**Concentrações médias horárias:** Ocorreu sobretudo entre as 13 e as 17 horas, com uma média de 3,7 esporos/m³ de ar (Fig. I 118).

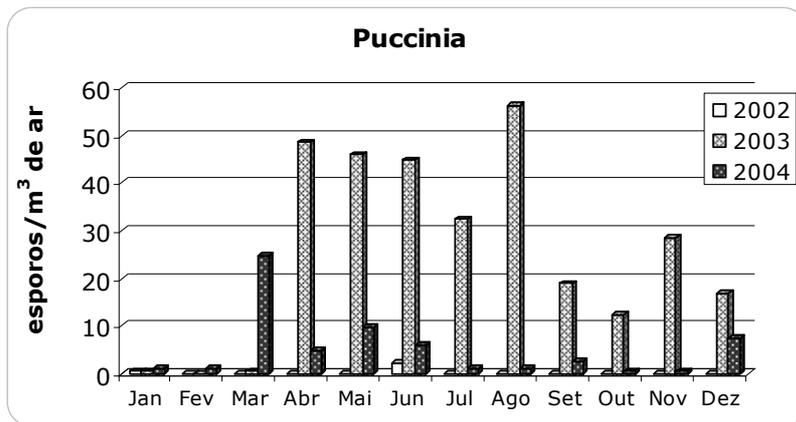


Fig. I 117. Distribuição mensal dos esporos de *Puccinia* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

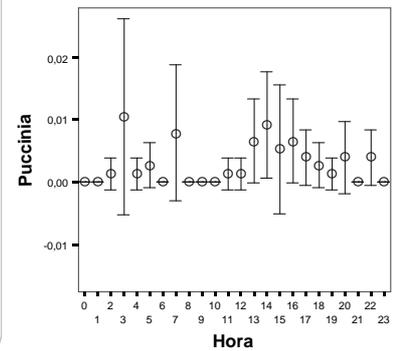


Fig. I 118. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Puccinia* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 51. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Puccinia* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,062	0,056	0,061	0,017	-0,021	-0,197**

A concentração deste fungo é aparentemente favorecida pelo vento direccionado do quadrante Este.

***Sordaria* (Ces. & De Not. 1863)**

Família: Sordariaceae

Ordem: *Sordariales*

Classe: *Ascomycetes*

Subdivisão: *Ascomycotina*

Divisão: *Eucomycota*

Distribuição: Cosmopolita, comum na Europa e América do Norte.



Morfologia dos esporos: Em forma de barril, plurisseptados com septos transversais e longitudinais, coloração castanha ou verde (ver Lâmina 2. T, pág. 172).

Ecologia/Patogenicidade: Coloniza uma vasta gama de plantas, ocorre geralmente em matéria em decomposição, no solo, em folhas e sementes.

Alergenicidade: A sua alergenicidade ainda não foi documentada.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2003 e 2004, com 4,86 esporos/ m³ de ar e 10,8 esporos/ m³ de ar, respectivamente.

Concentrações médias mensais: Ocorreu entre Março e Junho e entre Setembro e Dezembro, atingindo em Novembro de 2004, os valores máximos 3,78 esporos/m³ de ar (Fig. I 119).

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência surgiram sobretudo a partir das 16 horas, atingindo-se um pico concentração de 1,6 esporos/m³ às 21 horas (Fig. I 120).

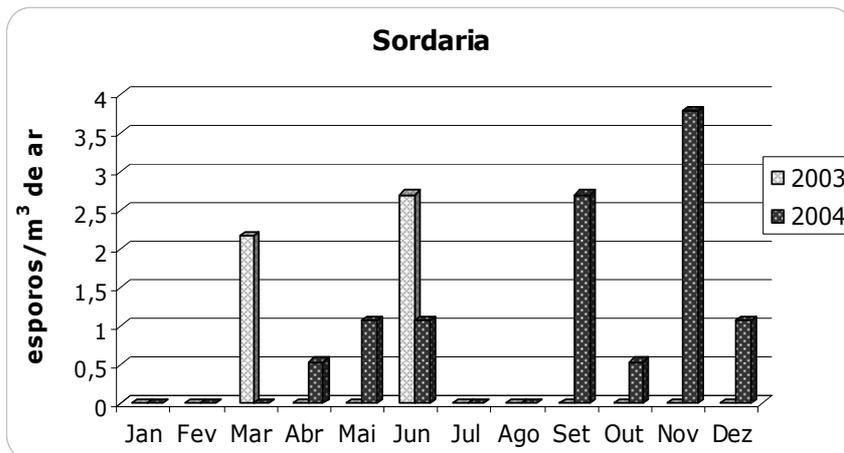


Fig. I 119. Distribuição mensal dos esporos de *Sordaria* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

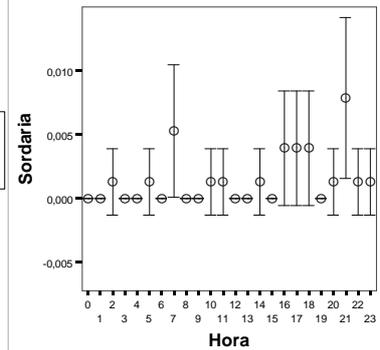


Fig. I 120. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Sordaria* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 52. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Sordaria* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,180*	-0,089*	-0,192**	-0,011	0,004	0,001

Observou-se uma correlação negativa entre a ocorrência deste fungo e a temperatura.

***Spegazzinia* (Sacc. 1879)**

Família: Dematiaceae

Ordem: *Hyphales*

Classe: *Deuteromycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: Ocorre em regiões de clima temperado a moderadamente tropical.



Morfologia dos esporos: Globosos, plurisseptados, coloração castanha (ver Lâmina 2. U, pág. 172).

Ecologia/Patogenicidade: Ocorre no solo, Coloniza diversas espécies de árvores, sendo saprobiótico em vestígios de plantas.

Alergenicidade: A sua alergenicidade ainda não foi documentada.

Concentrações totais anuais: Ocorreu entre Março e Outubro, com um total de 71 esporos/m³ de ar, 90% do qual foi contabilizado em 2003.

Concentrações médias mensais: Em Maio de 2003 e de 2004 registou-se o pico de concentração mais elevado com 38,34 e de 3,24 esporos/m³ de ar, respectivamente (Fig. I 121).

Concentrações médias horárias: Ocorreu um pico às 7 horas de concentração média de 7,2 esporos/m³ de ar, reaparecendo entre as 13 e as 17 horas (Fig. I 122).

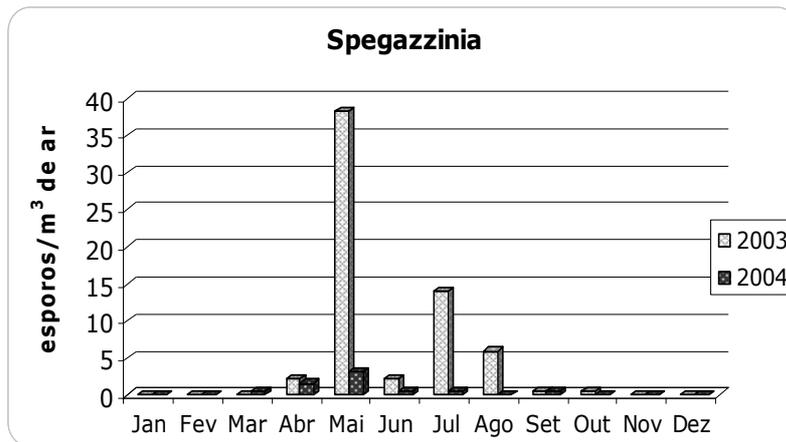


Fig. I 121. Distribuição mensal dos esporos de *Spegazzinia* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

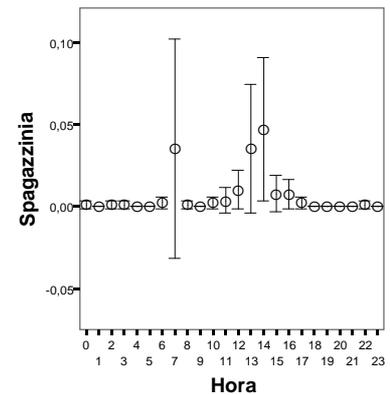


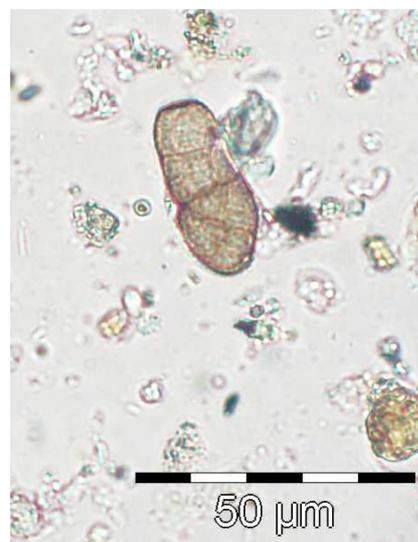
Fig. I 122. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Spegazzinia* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 53. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Spegazzinia* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,017	-0,015	-0,013	-0,031	-0,008	-0,035

Da análise de correlção não se constata a influência clara dos parâmetros meteorológicos na concentração deste fungo.

Stemphylium* (Wallr. 1833)*Família:** Pleosporaceae**Ordem:** *Pleosporales***Classe:** *Ascomycetes***Subdivisão:** *Ascomycotina***Divisão:** *Eucomycota***Distribuição:** Cosmopolita, frequente no ar.

Morfologia dos esporos: Tipicamente oblongos, arredondados na extremidade, elipsóides ou subesféricos. Apresenta septos transversais e longitudinais ou mesmo oblíquos, de aspecto liso, verrugoso ou equinulado. Coloração esverdeada, dourada ou castanha. Dimensões médias: 15-35 x 20-55 µm (ver Lâmina 2. V, pág. 172).

Ecologia/Patogenicidade: *Stemphylium* é um fungo amplamente distribuído, comum na vegetação em decomposição e no solo. Saprobíótico ou por vezes fracamente parasita numa vasta gama de plantas. Comum em folhas e caules.

Alergenicidade: Implicado em reacções de hipersensibilidade do tipo I (polinose e asma) Apresenta alergénios comuns com *Alternaria*.

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano totalizando 76 esporos/m³ de ar no período de estudo. À excepção de 2002, registou-se em média 35 esporos/m³ de ar/ano.

Concentrações médias mensais: Entre Abril e Junho observaram-se os valores máximos de 9,72 esporos/m³ de ar em 2003 e 7,56 esporos/m³ de ar em Maio de 2004 (Fig. I 123).

Concentrações médias horárias: Os picos de ocorrência atingiram três máximos: à 1h, 11 e 17 horas, com uma média de 1,6 esporos/m³ de ar (Fig. I 124).

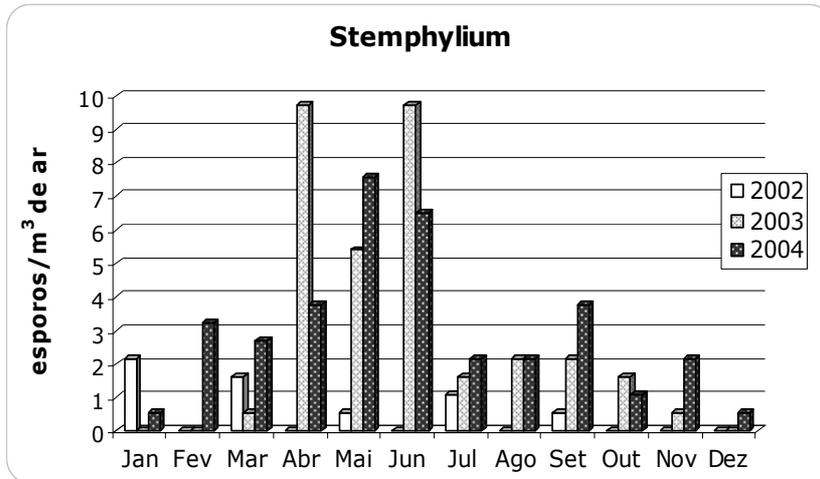


Fig. I 123. Distribuição mensal dos esporos de *Stemphylium* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

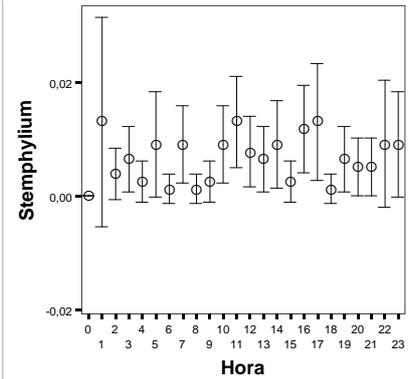


Fig. I 124. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Stemphylium* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 54. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Stemphylium* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,002	-0,008	0,001	0,069*	-0,039	0,012

O fungo apresentou correlação positiva, embora fraca, com o parâmetro humidade.

***Tetraploa* (Berk. & Broome 1850)**

Família: Dematiaceae
Ordem: *Hyphales*
Classe: *Deuteromycetes*
Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: Regiões tropicais e subtropicais.



Morfologia dos esporos: Em forma de estrela, plurisseptados com septos transversais, coloração castanha (ver Lâmina 2. W, pág. 172).

Ecologia/Patogenicidade: Coloniza uma ampla variedade de plantas. Ocorre de preferência na base de folhas e caules e junto ao solo.

Alergenicidade: A sua alergenicidade ainda não foi documentada. *Tetraploa aristata* foi documentada como sendo causadora de queratite.

Concentrações totais anuais: Ocorreu em 2003 e 2004, com concentrações totais de 11,34 e 0,54 esporos/m³ de ar, respectivamente.

Concentrações médias mensais: O género ocorreu entre os meses de Agosto e Novembro de 2003, atingindo os 5,4 esporos/m³ de ar. Em Setembro de 2004 registou-se uma ocorrência de 0,54 esporos/m³ de ar (Fig. I 125).

Concentrações médias horárias: Ocorreu um pico máximo de concentração de 1,62 esporos/m³ de ar às 8 horas, embora o período de ocorrência do género se registre entre as 13 e as 19 horas (Fig. I 126).

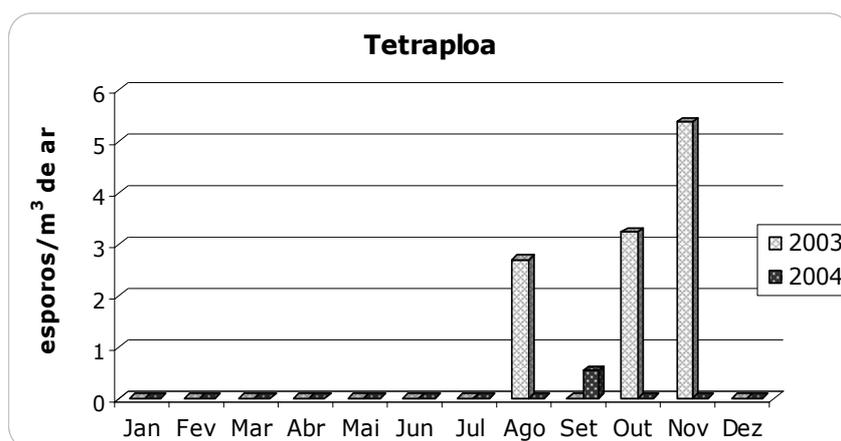


Fig. I 125. Distribuição mensal dos esporos de *Tetraploa* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

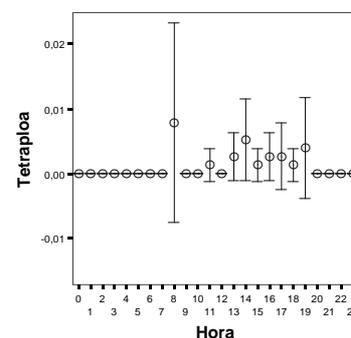


Fig. I 126. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Tetraploa* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 55. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Tetraploa* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,04	0,044	0,037	0,049	0	0,188**

Observou-se uma correlação positiva entre a ocorrência deste fungo e o vento direccionado do quadrante Norte-Noroeste.

Torula (Pers. 1794)

Família: Dematiaceae

Ordem: *Hyphales*

Classe: *Deuteromycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Divisão: *Eumycota*

Distribuição: Cosmopolita, comum em Regiões temperadas.



Morfologia dos esporos: De forma cilíndrica com extremidades redondas, elipsóides, fusiformes ou subesférios, de aspecto liso, verrugoso ou equinulado, plurisseptados, com septos transversais, coloração castanha ou verde. Dimensões médias: 5-11 x 10-70 µm (ver Lâmina 2. X, pág. 172).

Ecologia/Patogenicidade: Coloniza uma ampla variedade de plantas. Ocorre em detritos vegetais, na madeira, no solo e no ar. Saprobíótico, comum em caules, frutos e folhas de algumas espécies vegetais, nomeadamente de gramíneas.

Alergenicidade: Alergénico. *Torula herbarum* foi documentada como causadora de reacções de hipersensibilidade do tipo I (polinose e asma).

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano totalizando 391 esporos/m³ de ar no período de estudo, e 278 esporos/m³ somente em 2003.

Concentrações médias mensais: Os picos de ocorrência surgiram entre Maio de 2003, com 115 esporos/m³ de ar, e em Junho de 2004, com 19 esporos/m³ de ar, diminuindo progressivamente até à época de Inverno (Fig. I 127).

Concentrações médias horárias: Ocorreu entre as 12 e as 13 horas, atingindo uma concentração média de 9 esporos/m³ de ar (Fig. I 128).

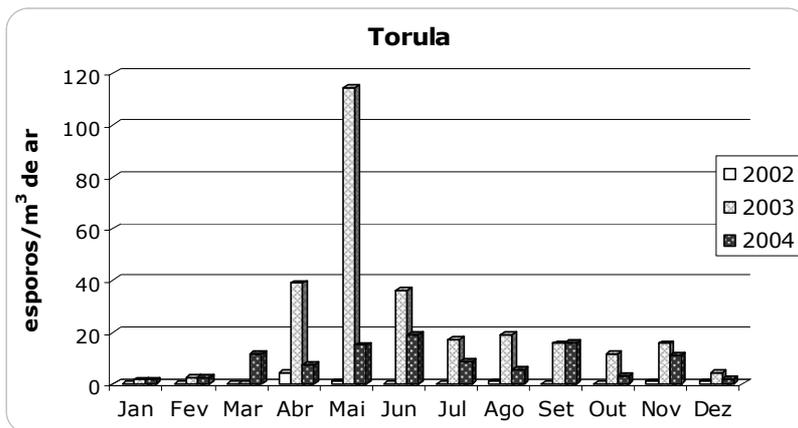


Fig. I 127. Distribuição mensal dos esporos de *Torula* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

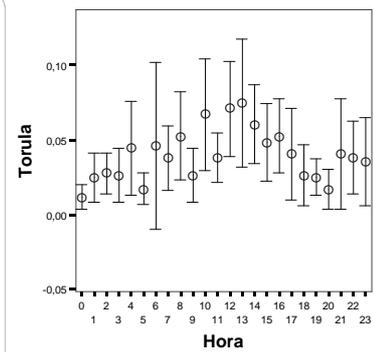


Fig. I 128. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Torula* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 56. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Torula* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	0,050	0,053	0,030	0,002	-0,008	-0,053*

Observou-se uma correlação positiva entre a ocorrência deste fungo e o vento direccionado do quadrante Este.

Venturia (De Not. 1844)**Família:** Venturiaceae**Ordem:** Pleosporales**Classe:** Ascomycetes**Subdivisão:** Ascomycotina**Divisão:** Eumycota**Distribuição:** Cosmopolita, ocorre em Regiões temperadas da Europa, América do Norte e Ártico.**Morfologia dos esporos:** De forma lobosa, unisseptada, coloração castanha (ver Lâmina 2. Z, pág. 172).**Ecologia/Patogenicidade:** Ocorre em folhas mortas. Coloniza uma ampla variedade de plantas, nomeadamente de Rosáceas (p. ex: pereira e macieira).**Alergenicidade:** A capacidade de provocar patologia alérgica no homem é muito pouco conhecida, tal como a capacidade alergizante.**Concentrações totais anuais:** Ocorreu ao longo de todo o ano, totalizando 469 esporos/m³ de ar no período de estudo. Em 2003 obtiveram-se as concentrações mais elevadas, 329 esporos/m³ de ar, seguido de 2004, com 139 esporos/m³ de ar em 2002, e com 1,08 esporos/m³ de ar.**Concentrações médias mensais:** Em 2003 a ocorrência do género incidiu nos meses de Abril e Junho, período em que se registou o pico de concentração máxima de 100 esporos/m³ de ar. Em 2004, ocorreu o pico máximo de 356 esporos/m³ de ar no mês de Maio (Fig. I 129).**Concentrações médias horárias:** Os picos de ocorrência surgem a partir das 10 horas atingindo um pico às 16 horas, com um média de 12 esporos/m³ de ar, diminuindo até os 3 esporos/m³ de ar às 22 horas (Fig. I 130).

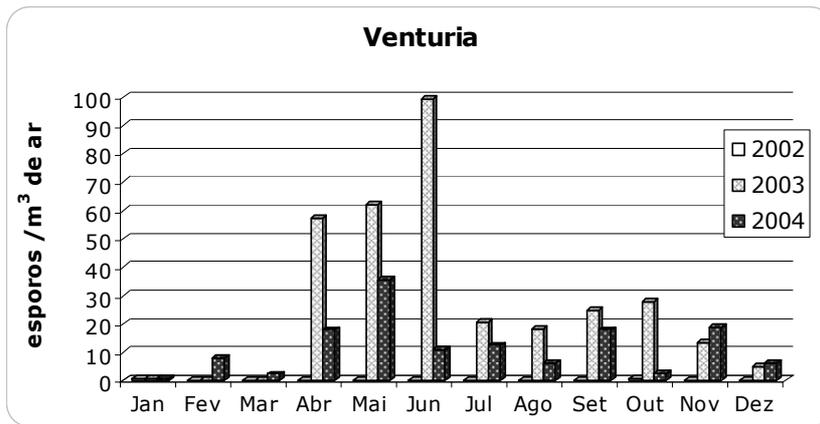


Fig. I 129. Distribuição mensal dos esporos de *Venturia* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

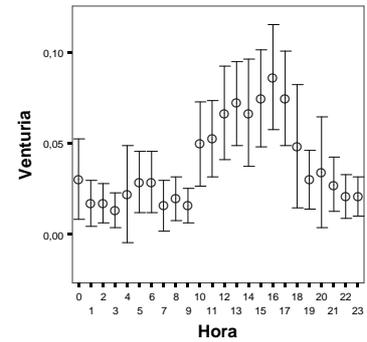


Fig. I 130. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Venturia* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 57. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Venturia* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
r	-0,006	-0,019	-0,002	0,393**	-0,027	0,113**

Observou-se uma correlação positiva entre a ocorrência deste fungo, a humidade e o vento de N-NW.

Xylaria (Hill ex Schrank 1789)

Família: Xilariaceae

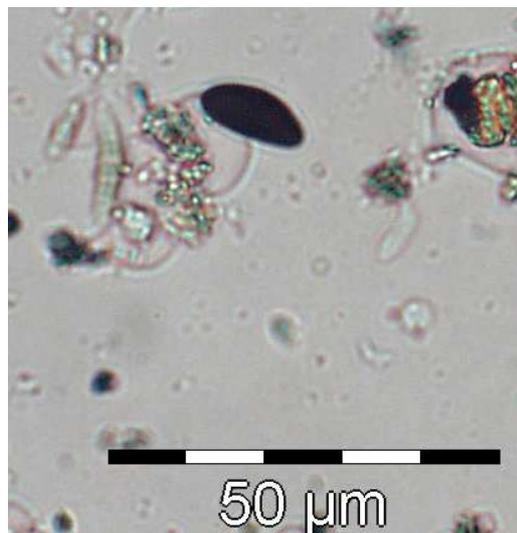
Ordem: Xylariales

Classe: Ascomycetes

Subdivisão: Ascomycotina

Divisão: Eumycota

Distribuição: Cosmopolita, ocorre em Regiões temperadas da Europa, América do Norte e Ártico.



Morfologia dos esporos: Elípticos, de coloração negra e aspecto liso. Dimensões médias: 11-34 X 5-9 µm (ver Lâmina 2. Y, pág. 172).

Ecologia/Patogenicidade: Ocorre em folhas em decomposição. Coloniza uma ampla variedade de plantas, nomeadamente de Rosáceas (p. ex: pereira e macieira).

Alergenicidade: A capacidade de provocar patologia alérgica no homem é muito pouco conhecida tal como a capacidade alergizante.

Concentrações totais anuais: Ocorreu a partir de Abril, totalizando 16,2 esporos/m³ de ar no período de estudo. Em 2004 obtiveram-se as concentrações mais elevadas, 10,8 esporos/m³ de ar, seguido de 2003 com 4,32 esporos/m³ de ar e de 2002 com 1,08 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: Abril 2003 e Novembro de 2004 foram os meses em que se observaram as concentrações máximas, ocorrendo em média 4,6 esporos/m³ de ar (Fig. I 131).

Concentrações médias horárias: Os valores mantiveram-se ao longo do dia abaixo dos 0,2 esporos/m³ de ar, registando-se um pico de concentração às 7 horas, com 1,26 esporos/m³ de ar (Fig. I 132).

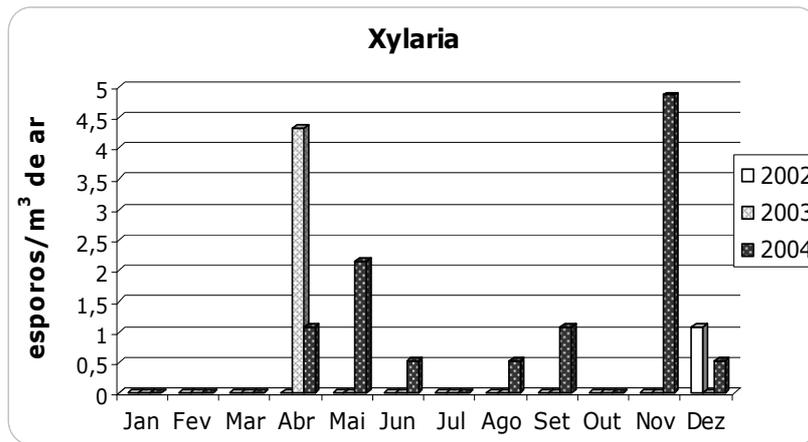


Fig. I 131. Distribuição mensal dos esporos de *Xylaria* na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

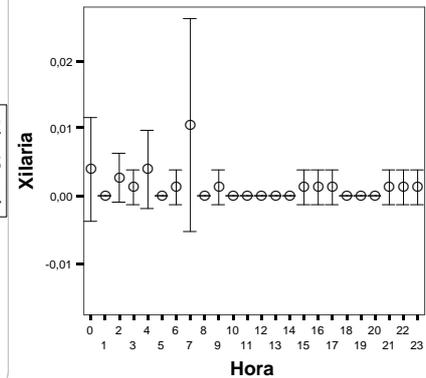


Fig. I 132. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de *Xylaria* por hora.

Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 58. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias do tipo *Xylaria* e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (%)	Direção do Vento
r	-0,037	-0,057	-0,031	0,051	-0,014	-0,010

A concentração deste fungo não apresenta nenhuma correlação com os parâmetros meteorológicos.

Esposos de Fetos

Gêneros: *Adiantum* (Avenca),
Dryopteris (Dentebrum),
Pteridium (Feto comum)
Polypodium (Polipódio)

Divisão: Pteridophyta

Distribuição: Cosmopolitas. Ocorrem em regiões temperadas, tropicais e subtropicais.



Morfologia dos esporos: Forma reniforme ou triangular-obtuso (bilateral ou subtetraédricos, com extremidades convexas). Abertura em forma de trilete. Superfície verrucosa, escábrica, granulada, gemada ou psilada. Tamanho médio inferior a 40 μm.

Ecologia: Os fetos ocorrem geralmente em locais sombrios e húmidos, surgindo sob árvores e demais vegetação. Podem surgir em locais soalheiros, apresentando um amarelecimento das folhas.

Alergenicidade: Não foi documentado um carácter alérgico a este tipo de esporos.

Concentrações totais anuais: Ocorreu ao longo de todo o ano, totalizando 237 esporos/m³ de ar em todo o período de estudo. Em 2003 obtiveram-se as concentrações mais elevadas, 137 esporos/m³ de ar, seguido de 2004, com 55 esporos/m³ de ar, e de 2002 com 8,64 esporos/m³ de ar.

Concentrações médias mensais: Ocorreram sobretudo entre os meses de Agosto e Outubro, observando-se o pico máximo em Setembro de 2003, com 75 esporos/m³ de ar e 23 esporos/m³ de ar em Outubro de 2004 (Fig. I 133).

Concentrações médias horárias: Os esporos de fetos ocorrem sobretudo no início da manhã e tarde, registando-se os picos de concentração de 8 esporos/m³ (Fig. I 134).

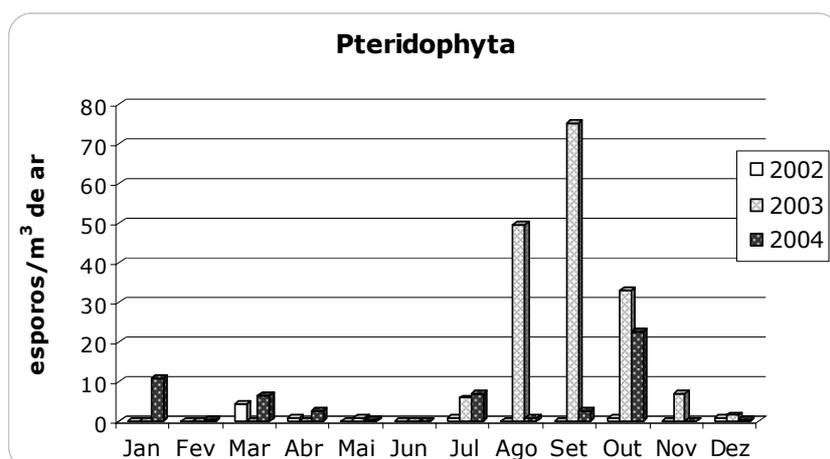


Fig. I 133. Distribuição mensal dos esporos de fetos (Pteridophyta) na atmosfera do Funchal no período 2002-2004.

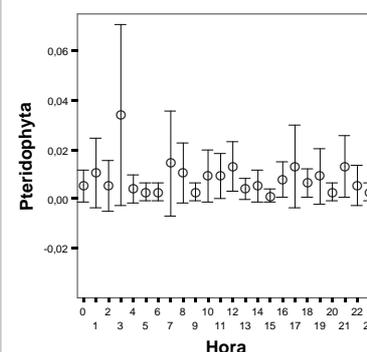


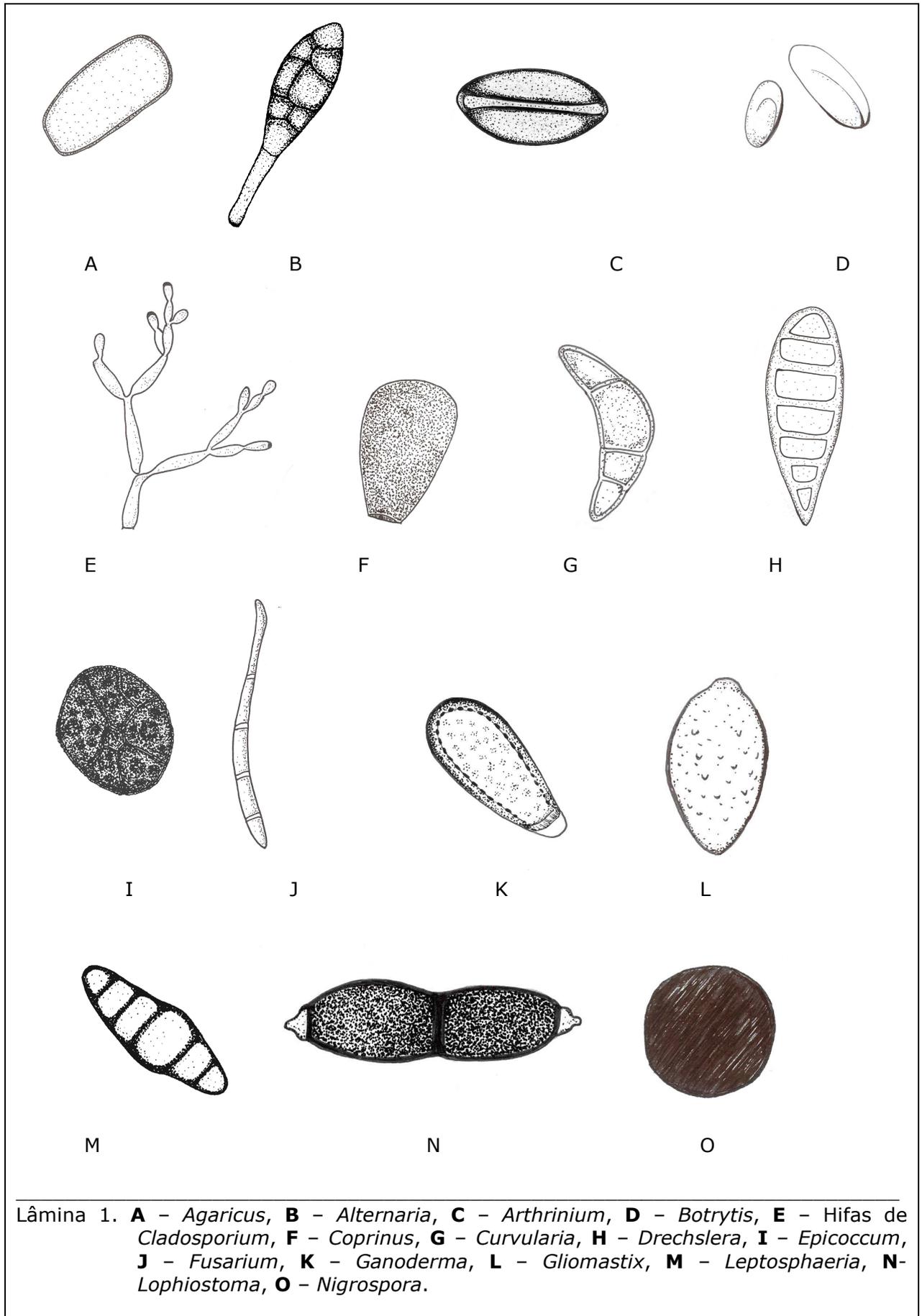
Fig. I 134. Intervalo de confiança (95%) do número médio de esporos de esporos de fetos (Pteridophyta) por hora.

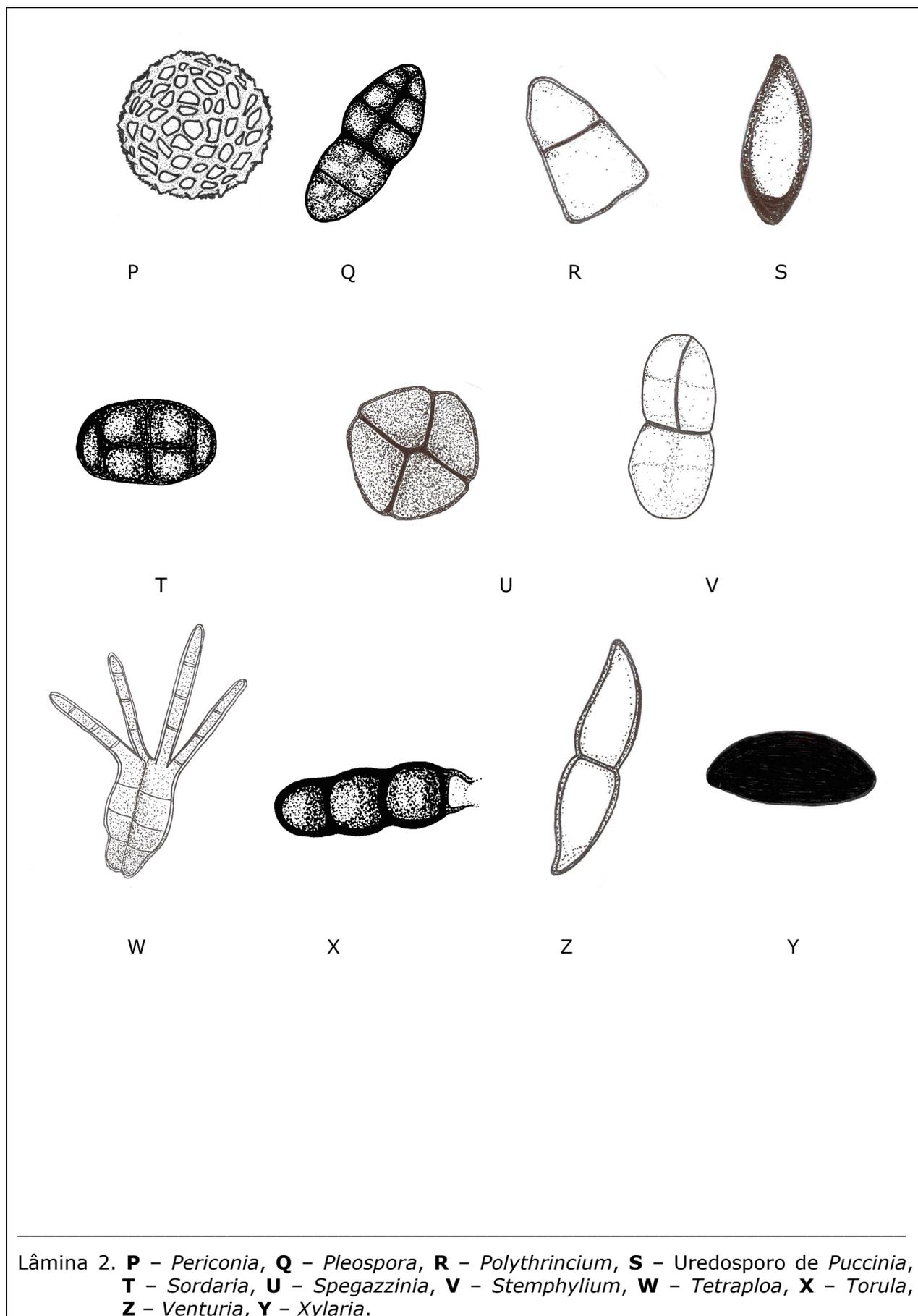
Correlação com as variáveis meteorológicas:

Tabela I 59. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre as concentrações horárias dos esporos de Fetos e as variáveis meteorológicas. Nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)	Direcção do Vento
Adiantum	0,003	-0,011	0,004	0,033	-0,014	0,020
Dryopteris	0,059	0,061	0,067*	-0,032	-0,021	-0,054
Pteridium	0,167**	0,166**	0,165**	-0,003	-0,034	-0,028
Polypodium	0,127**	0,125**	0,125**	0,037	-0,017	0,006
Pteridophyta	0,02	0,02	0,017	0,025	-0,007	-0,044

A análise de correlação sugere a existência de correlação positiva a temperatura e as concentrações de esporos de *Polypodium* e *Pteridium*.





DISCUSSÃO

1. Análise dos Tipos Polínicos

Asteraceae

O género *Artemisia* foi observado num período restrito em 2002, entre Outubro e Novembro, tendo-se observado neste último mês o período de polinização principal (P.P.P.) com uma duração de 10 dias. Foi observável entre Agosto e Outubro de 2004, com um P.P.P. de 66 dias, constatando-se, no global, uma concentração polínica baixa. As somas anuais de *Artemisia* observadas por outros autores no Norte da Europa e SE de Espanha, reportam-na como um género que mantém um padrão de ocorrência constante no período de polinização (Detant e Nolard 2000; Giorato et al, 2000), surgindo geralmente entre Julho e Agosto (Kasprzyk et al, 2001). Em Netzer Sireni (Israel), vila localizada numa planície costeira do Mediterrâneo, Waisel et al (2004) observaram-na essencialmente entre Setembro e Outubro. O total de pólenes contabilizado por aqueles autores foi de 94 grãos/m³, 70% dos quais pertencentes ao género *Artemisia*. No entanto, foi em Outubro que se registaram as concentrações mais baixas para o Funchal, não só para o género, como também ao nível da família, provavelmente devido à ocorrência de precipitação. O cenário foi oposto em Agosto e Setembro de 2004, altura em que se registaram as temperaturas mais elevadas. Adicionalmente, a análise de correlação de Spearman sugere que o aumento da temperatura tem uma influência positiva na incidência do pólen de *Artemisia*.

No que concerne à variação intra-diurna, Kasprzyk et al (2001) obtiveram um padrão horário semelhante ao observado por nós, detectando picos máximos de concentração após as 12 horas.

Boraginaceae

A observação deste tipo polínico fora da época de floração típica evidencia a ocorrência de refluções em Setembro e Outubro de 2003. Nitiu et al (2003) verificaram que este tipo polínico atingiu uma incidência máxima em Janeiro na cidade de Buenos Aires (Argentina), correspondendo a 6% do total observado. Para a cidade do Funchal, esse máximo foi atingido em Abril, tendo este tipo polínico contribuído em 1,17% para o total observado. A análise de correlação não demonstra a existência de correlação entre as variáveis ambientais e concentrações diárias do pólen de *Echium* na atmosfera do Funchal. Rodríguez et al (2005) documentam para a Região da Extremadura (SW de Espanha) a importância da direcção do vento e do ar quente e seco na libertação do pólen de *Echium*

para a atmosfera, aumentando a sua concentração. Refira-se, que para aquela região, o pico de concentração diária atingiu os 35,9 grãos/m³ sendo as variações inter anuais da ordem dos 64,2 e 614,4 grãos/m³, enquanto que para o Funchal, a concentração total observada foi de 13 grãos/m³ de ar para ambos os anos.

Chenopodiaceae-Amaranthaceae

A época polínica verificada em 2003 foi a mais extensa do período de estudo (cerca de 9 meses), e de 5 meses, em 2004. Segundo Giner e García (2002) e Giner et al (2002) esta família apresenta uma época polínica normalmente longa, com concentrações máximas nos meses de Fevereiro, Março e Setembro. Chenopodiaceae-Amaranthaceae representam cerca de 12% do pólen total anual observado na região de Múrcia. Para o Funchal, este tipo polínico contribui em 3 a 4% para o total anual. Trabalhos anteriores demonstram que o pólen de vários membros deste tipo polínico revelam um pico de concentração distinto durante o Verão e Outono, (Julho-Outubro) (Waisel et al, 2004). Por seu turno, Nitiu (2004) determinou a época polínica para este tipo na cidade de La Plata, Argentina, com início em Setembro e final em Abril, atingindo picos máximos em Março. O modelo de variação intra-diurno verificado para o Funchal é semelhante ao descrito por Nitiu (2004), que observou este pólen sobretudo entre as 10 e as 14 horas, e durante a Primavera e Verão. As correlações entre a concentração de pólen de Chenopodiaceae e as variáveis meteorológicas não foram significativas, pelo que não se observa a sua influência clara sobre as concentrações. Contudo, segundo Moreno-Grau et al (2000), trata-se de um tipo polínico cuja ocorrência na atmosfera está potenciada pelos dias quentes e secos e pela diminuição dos níveis de humidade relativa, parâmetro inversamente relacionado com a concentração deste pólen (Recio et al, 1998). É de notar que um dos picos de concentração polínica foi coincidente com o mês em que se registaram os valores de humidade relativa mais baixa (Maio de 2003), bem como o pico observado em Junho de 2004, tendo os valores de humidade atingido os 60%.

Corylaceae

O padrão de ocorrência anual deste tipo polínico para o Funchal é similar ao observado por Ciancianini (2000), Giner (2002) e Giorato et al (2000), embora trabalhos como os de Kasprzyk (2003) e Kasprzyk et al (2004) observassem, para várias regiões polacas, uma época polínica a incidir entre Fevereiro e Abril. Da análise de correlação não se constata a influência de nenhuma das variáveis meteorológicas para *Corylus*. Contudo, as concentrações deste tipo polínico são reduzidas com o aumento da altitude e condições de vento locais (Gehrig e Peeters, 2000), sendo provavelmente mais afectadas pelas condições meteorológicas no Inverno (Detandt e Nolard, 2000).

Cupressaceae

O padrão de ocorrência para a família em 2003 coincide com o observado por Ciancianaini (2000) e Giner (2000). Estes autores verificaram que o pólen de *Cupressaceae* ocorre no final de Setembro e início de Julho, representando 19% do pólen total para a região de Múrcia. Para o Funchal, esse valor não ultrapassa os 5%. Na região de Múrcia o período polínico estende-se de Fevereiro a Abril devido a *C. sempervirens* e *Juniperus sp.*, surgindo um pico no Outono devido a *Cupressus arizonica*. Por seu turno, Caiola et al (2002) verificaram que o pico de concentração ocorreu entre Fevereiro e Março. Para o Funchal o P.P.P. deste tipo polínico foi observado em alturas distintas ao longo dos 3 anos de estudo. No trabalho de Aira et al (2001) é referido um P.P.P. a incidir sobretudo nos meses de Dezembro a Maio, e os valores mais elevados, nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março. Estes mesmos autores constataram ainda, que as concentrações mais elevadas de pólen se registaram entre as 11 e as 15 horas, tendo esses máximos de ocorrência se registado para o Funchal entre as 16 e as 21 horas.

Relativamente à acção das variáveis ambientais Aira et al (2001) verificaram que a precipitação e a humidade relativa mantêm uma correlação negativa com este tipo polínico. Apesar de obtermos uma correlação negativa para aquelas variáveis, estas não são significativas. Galán et al (1998) em Jones e Harrison (2004), verificaram que as concentrações deste pólen aumentam com a temperatura, sobretudo nos dias mais secos. Contudo, tais concentrações são, segundo aqueles autores, difíceis de prever dado não haver um padrão anual claro e recorrente, como na maioria do pólen proveniente de árvores.

Ericaceae

Observou-se uma correlação negativa fraca entre a concentração de pólen de *Erica* na atmosfera do Funchal e a precipitação. Rodríguez-Rajo et al (2005) constataram para a região de Vigo (NW de Espanha), que a época polínica de Ericaceae é influenciada negativamente pela precipitação, sobretudo a registada em Março, sendo responsável pelo decréscimo dos valores de concentração de pólen total anual. Os P.P.P. deste *taxon* para a cidade do Funchal tiveram uma duração máxima de 3 meses, surgindo em alturas do ano similares ao longo do período de estudo. Ao longo do dia ocorreram dois picos distintos de concentração deste tipo polínico (8h e 21h), facto igualmente constatado por Rodríguez-Rajo et al (2005), que o observaram entre as 5-6 horas e entre as 17 e as 18h.

Euphorbiaceae

A concentração de pólen de *Euphorbia* não apresenta correlação com nenhuma variável meteorológica, o que poderá dever-se à escassa representação deste *taxa*. No entanto, é provável que o aumento da temperatura, condições de humidade relativa baixa e de

precipitação tivessem propiciado o aumento da concentração destes grãos de pólen, resultando no padrão de variação mensal observado. Da mesma forma, observa-se que no padrão intra-diurno, estes pólenes ocorrem nas horas de maior calor.

Fabaceae

A concentração de pólen de *Acacia* não apresenta correlação com nenhuma variável meteorológica, o que poderá dever-se à escassa representação deste *taxa*. Por seu turno, observou-se uma correlação positiva entre a concentração de pólen de *Robinia* e a temperatura. A análise de correlação sugere que o aumento da temperatura tenha um efeito positivo na representação deste tipo polínico na atmosfera, ao invés da precipitação. De facto, em 2003, estes pólenes foram observados sobretudo entre Março e Setembro, período em que a temperatura foi mais elevada e a precipitação mínima. Em 2004, notou-se um decréscimo da concentração polínica de Abril a Maio, o que poderá dever-se à ocorrência de precipitação neste último mês. Quanto à variação intra-diurna, o aumento da temperatura parece favorecer o aparecimento destes pólenes durante a manhã e tarde (9-16 h).

O facto desta planta apresentar um período de floração curto, não mais de um mês, desde o final de Março (Giner et al, 2002) e de se observar uma presença prolongada na atmosfera, sobretudo em Julho, poderá dever-se, segundo Giner et al (2002), à semelhança morfológica do polén de *Robinia* com outros *taxa*. Tal poderá explicar a extensão das épocas polínicas e respectivos P.P.P. descritos para o Funchal.

Ginkgoaceae

Observou-se uma correlação negativa fraca entre concentração de pólen de *Ginko* e a temperatura máxima. No entanto, a baixa representação deste tipo polínico para o Funchal, não nos permite de momento interpretar a acção deste ou de outros parâmetros ambientais na concentração deste pólen.

Myrtaceae

Embora a concentração de pólen de Myrtaceae não apresente correlação com nenhuma das variáveis meteorológicas, o que poderá dever-se à escassa representação deste *taxa*, é provável que a temperatura, direcção e intensidade do vento tenham uma influência importante na concentração destes pólenes. À excepção de 2002, os P.P.P. ocorreram em alturas do ano similares, com uma duração de 8 a 9 meses. Foram observados pólenes ao longo de todo o dia, sobretudo entre as 11 e as 13 horas. Esta variação intra-diurna é similar aos dados observados por Bhattacharya et al (1999) para o género *Eucalyptus*, que registou máximos de concentração às 14 horas.

Myricaceae

A concentração de pólen de *Myrica* não apresenta correlação com as variáveis meteorológicas, o que poderá dever-se à escassa representação deste taxa. Na altura do ano em que estes taxa foram observados registou-se um aumento gradual da temperatura na cidade do Funchal, facto que poderá ter influenciado a maturação e liberação do pólen da antera e consequentemente, a sua presença na atmosfera (Moreno-Grau et al, 2000).

Nyctaginaceae

Devido à escassa representação deste taxa não se observa uma influência clara das variáveis meteorológicas neste tipo polínico. Quanto ao seu padrão de variação intra-diurno, é provável que a maior ocorrência destes pólenes seja propiciada pelo aumento da temperatura.

Pinaceae

Green et al (2003) verificaram que a estação polínica de *Pinus* está confinada aos meses de Inverno. As contagens do pólen de *Pinus* contribuíram em 4,5% do pólen total contabilizado em Brisbane (Austrália), e 9,6% em Múrcia (Espanha) (Giner, 2002). No Funchal esse valor é de 6,25%, estando a época polínica igualmente confinada ao Inverno. Green et al (2003) verificaram que este tipo polínico correlaciona negativamente com a precipitação e as temperaturas máxima e mínima durante o período de polinização principal. O surgimento e duração média da estação polínica estão directamente relacionados com as médias mais baixas de temperatura máxima. Estas constatações corroboram a análise dos nossos dados para este taxa. Adicionalmente, os picos de concentração diária registam-se entre as 17 e as 21h. Foi igualmente constatado que as concentrações de *Pinus* sp. correlacionam negativamente com a precipitação, humidade relativa e o vento vindo do mar (Jones e Harrison, 2004). Porém, os coeficientes de correlação para aqueles parâmetros, por nós obtidos, não são significativos.

Plantaginaceae

O aparecimento deste tipo polínico na atmosfera ocorre essencialmente entre Abril e Julho, embora em 2003, surja em Janeiro e inclusive em Setembro e Dezembro, provavelmente devido a refluções. Nitiu (2004) documenta-o desde o início da Primavera até o final do Verão. Por outro lado, foi observado noutras cidades europeias um período prolongado de permanência do pólen de *Plantago* na atmosfera (Giner et al, 2002). Os P.P.P verificados no Funchal tiveram uma duração mínima de 2 meses e máxima, de 4 meses, altura em que ocorreu o pico máximo de concentração (Maio de 2003 e 2004). No trabalho de Caiola

et al (2002), refere-se a ocorrência do pico de concentração para Plantaginaceae em Junho. Nitiu (2004) observou que as concentrações máximas se registavam entre as 12 e as 14 horas. No Funchal, esse pico foi observado um pouco mais tarde, às 16 h.

Observou-se uma correlação negativa significativa entre a concentração de pólen de *Plantago* e a precipitação. Todavia, dado à baixa representação deste pólen na atmosfera, a análise de correlação não permite todavia antever uma influência clara das variáveis ambientais nas concentrações deste tipo polínico.

Platanaceae

Tendo sido observado num período restrito do ano (Abril e Maio), observou-se um P.P.P. de 17 dias em 2004. Jato et al (2001) identificaram o P.P.P deste *taxon* na região de Santiago de Compostela centrado nos meses de Março a Abril, com uma duração média de 23 dias. Gabarra et al (2002) identificaram os mesmos meses para a região da Catalunha (Espanha). Por sua vez, Nitiu e Mallo (2002) observaram as concentrações máximas de espécies de *Platanus* entre os meses de Agosto e Setembro. Relativamente à variação intra-diurna, Jato et al (2001) registaram as maiores concentrações de pólen entre as 17 horas e as 20 horas. No Funchal, este tipo polínico ocorreu essencialmente entre as 12 e as 18 horas, com picos às 15h. Nitiu e Mallo (2002) constataram que as maiores concentrações se registavam pelas 14 horas, dados que corroboram os obtidos para o Funchal.

A análise de correlações sugere a influência negativa do vento do quadrante Este-Sudeste na incidência polínica. Dado que a grande maioria das espécies de *Platanus* ocorrem a SW do Funchal, o vento direccionado do quadrante oposto poderá exercer um efeito de lavagem, reduzindo assim a representatividade dos pólenes.

Poaceae

Os P.P.P surgiram ao longo do período de estudo cada vez mais cedo, tendo uma duração mais prolongada em 2003, comparativamente aos outros anos. Vários trabalhos têm apontado as mudanças climáticas e suas repercussões à escala regional como responsáveis pela floração e polinização precoce de várias espécies vegetais (Burge, 2002).

As somas anuais de Poaceae observadas por outros autores no Norte e SE de Espanha, reportam-na como um tipo polínico que mantém um padrão de ocorrência constante no período de polinização, embora outros autores observassem um padrão irregular na região da Basileia (Suíça), e em Bruxelas (Detandt e Nolard, 2000; Leuschner et al, 2000). A amplitude das estações do pólen de gramíneas difere inter-regiões devido a factores que influenciam a abundância e dispersão do pólen: tipo de vegetação local, área cultivada, altitude, latitude e clima (em Mesa et al, 2003). O pólen desta família tem uma presença

prolongada na atmosfera da maioria das cidades europeias, notando-se as maiores quantidades em Maio e Junho (Leuschner et al, 2000; Muñoz et al, 2000; Giner et al, 2002), facto que suporta as observações para a cidade do Funchal, bem como dos P.P.P determinados.

Porsbjerg et al (2003) observou para a cidade de Nuuk (Groelândia), que a época polínica ocorre entre os meses de Julho e Setembro, atingindo os níveis máximos em Agosto. Por sua vez, Syrigou et al (2003) verificou que a época polínica das gramíneas inicia-se em Março e termina em Junho, tendo uma duração média de 4 meses.

Norris Hill e Emberlin (1991) em Cariñanos et al (2000) verificaram que o pólen de Poaceae atingia níveis máximos entre as 18 e as 22 horas na cidade de Londres, particularmente nos dias mais secos. No Funchal, esse máximo foi registado pelas 20 horas.

A precipitação e a temperatura máxima são os factores mais importantes no controlo da amplitude das estações de pólen das gramíneas (Mesa et al, 2003). Embora os coeficientes de correlação obtidos por nós não sejam significativos, à excepção da precipitação, suportam em parte esta constatação. Poaceae ocorreu nos meses em que o aumento da temperatura se fez notar e a precipitação foi diminuta. Para algumas espécies de gramíneas o início da época polínica está associado com a temperatura cumulativa, a precipitação e as horas de sol. Foi constatado que as temperaturas máximas e médias constituíam os factores mais importantes na variação diária na concentração. Adicionalmente, verificou-se que a emissão de pólen de *Phleum sp.* ocorria no início do dia, atingindo picos de concentração aproximadamente 2 horas após o amanhecer, com a humidade relativa baixa e a intensidade do vento elevada (Jones e Harrison, 2004).

As gramíneas têm em geral épocas de polinização longas, com início em Fevereiro ou Março e acabando em Setembro ou Outubro. Os picos de maiores concentrações (normalmente Maio a Junho) estão associados com o aumento de temperatura e ausência de precipitação (Minero et al, 1998). Uma temperatura favorável promove a germinação das sementes e o avanço fenológico das gramíneas, facto que poderá explicar o aparecimento precoce destes *taxa* na atmosfera do Funchal.

Os factores pré-sazonais são mais importantes e os intra-sazonais parecem ter pouco efeito. Na prática, os picos no Verão poderão ser mais expressivos, especialmente se chove no fim da Primavera, o que favorece o crescimento das gramíneas no Verão (Minero et al, 1998).

Polygonaceae

Da análise de correlação, não se constata a influência das variáveis meteorológicas para *Rumex sp.*. Contudo, ao verificar as condições meteorológicas observadas durante a época

polínica, constata-se que a ocorrência deste *taxa* seja potenciada com o aumento gradual da temperatura e precipitação baixa. Refira-se que os P.P.P. incidiram entre Maio e Junho (com 16 dias em 2003 e 35 dias em 2004), reaparecendo pólenes em Novembro de 2004, provavelmente devido a fenómenos de reflutuação, que poderão decorrer de espécies de floração tardia, propiciada por condições de intensidade de vento moderadas, facilitando a dispersão dos grãos de pólen.

Solanaceae

Dado a bibliografia relativa ao *taxon* ser escassa e a análise de correlação inconclusiva, não se observa uma influência clara das variáveis meteorológicas sobre as concentrações, provavelmente devido à baixa representação destes pólenes. Refira-se, que o padrão de variação intra-diurna evidencia o aparecimento de pólenes em duas alturas distintas do dia (durante a manhã e final da tarde). Tal padrão poderá dever-se ao movimento de correntes convectivas diárias de ar, explicando a maior representação do pólen durante determinadas horas do dia.

Urticaceae

As ocorrências incidiram sobretudo entre Abril e Junho, atingindo em Maio de 2003 o pico máximo de concentração. Padrão semelhante ao observado por Longo et al (2004) para a região de Trieste (Itália). Em Santander (Espanha), o período de presença atmosférica de Urticaceae é desde Maio a Setembro, com picos máximos de Julho a Agosto (Rica e Torres, 2001). Kasprzyk et al (2001) observaram polén de *Urtica* na atmosfera de várias regiões da Polónia, de Junho a Agosto. Na região de Múrcia o pólen desta família tem uma presença prolongada na atmosfera, com as maiores incidências entre Fevereiro e Junho (Giner et al, 2002) facto que suporta igualmente as observações para a cidade do Funchal. Apesar do P.P.P ter diminuído ao longo do período em estudo, a presença de Urticaceae na atmosfera foi detectada cada vez cedo.

Os pólenes deste tipo polínico ocorreram ao longo de todo o dia sobretudo entre as 11 e as 16 horas. Kasprzyk et al (2001) observaram um padrão horário cujos picos máximos de concentração são atingidos após as 12 horas ou início da tarde, dados similares aos observados por nós. Estes autores detectaram ainda um pico definido de concentração a meio do dia, bem como as concentrações mínimas, durante a tarde e noite. Trigo et al (1996) verificaram que os padrões diurnos mostram picos que ocorrem geralmente das 10 às 16 horas, quando a temperatura atinge valores mais elevados.

Para Urticaceae, as diferenças anuais nas concentrações cumulativas de pólen devem-se primeiro às condições climatéricas no período da formação do pólen e secundariamente, à

influência de tais condições no processo de emissão do pólen para a atmosfera. A temperatura, humidade, precipitação e intensidade do vento são os parâmetros mais importantes na variação diurna, mas a sua importância relativa varia de ano para ano. Contudo, a temperatura constitui a influência mais importante na concentração de pólen na Primavera (Jones e Harrison, 2004). Por sua vez, a humidade seria a mais importante no Outono.

A análise de correlação por nós realizada revela um efeito positivo da temperatura na concentração de Urticaceae, e um efeito contrário da humidade. Contudo, seria interessante analisar a correlação antes e após a época polínica para confirmar a acção de cada variável em particular. Em trabalhos anteriores, documenta-se que durante os períodos de precipitação baixa, a concentração deste pólen seria predictível pela concentração do dia anterior. Urticaceae tem um mecanismo de libertação activo do pólen o qual é provocado pela temperatura e humidade. As concentrações encontradas foram negativas, com a humidade relativa, durante períodos de chuva intensa, mas correlacionadas positivamente com a humidade durante períodos de precipitação baixa (Jones e Harrison, 2004).

1.1. Composição Aerobiológica do Funchal

A cidade do Funchal representa uma composição aerobiológica particular devido ao clima favorável, que permite a floração de diversas espécies durante todo o ano.

No espectro polínico dominam as Poaceae e as Urticaceae, várias plantas ornamentais (Asteraceae, Boraginaceae, Cupressaceae) e as representativas da faixa norte da cidade (Ericaceae, Mytaceae e Pinaceae). As gramíneas constituem um elemento habitual na paisagem urbana bem como nas zonas limítrofes da mesma. Comparativamente a outras regiões do País, o espectro polínico é semelhante, embora se destaque para esta região a expressividade do tipo *Corylus* no total anual polínico.

Cerca de 75% dos tipos polínicos observados pertencem a *taxa* entomófilos, sendo na sua maioria, espécies de porte arbustivo e metade dos *taxa* de porte arbóreo com polinização anemófila. A biologia do pólen entomófilo limita sua representatividade na atmosfera, o que pode explicar as concentrações observadas. Contudo, vários *taxa* entomófilos podem produzir enormes quantidades de grãos (ex: *Salix*), e permanecer suspenso por longo tempo, representando um elemento constante e importante na aerobiologia de um local (Kasprzyk, 2004).

1.2. Fenologia de Tipos Polínicos

O estudo aerobiológico do Funchal confere dados para o estabelecimento do primeiro calendário polínico da região e a definição de padrões de sazonalidade. A fenologia dos principais tipos polínicos observados no Funchal permite definir o seguinte padrão:

- Em Janeiro surgem os primeiros taxa polínicos: Corylaceae, Cupressaceae e Pinaceae, estendendo-se até Julho e reaparecendo no fim do ano.
- Desde Fevereiro até Julho observa-se o tipo polínico Fabaceae.
- No período de Março a Junho predomina o pólen de taxa arbustivos: Euphorbiaceae, Chenopodiaceae-Amaranthaceae e Solanaceae, bem como de taxa arbóreos: *Ginko*, Platanaceae e *Myrica*.
- Entre Junho e Dezembro predomina o pólen de Asteraceae e *Robinia*.
- Um período sobreponível aos anteriores, representado por Myrtaceae, Poaceae, Urticaceae e Pteridophyta ocorrendo ao longo de todo o ano, com maior incidência entre Abril e Julho.

O predomínio do pólen de gramíneas e seus períodos de maior incidência (Maio a Julho) são igualmente observados noutras regiões de clima mediterrânico. Estas regiões têm a particularidade de apresentar estações polínicas semelhantes e condições climáticas que favorecem o seu crescimento (D'Amato e Liccardi, 1994; Palma-Carlos e Inácio, 1998).

1.3. Factores Condicionantes da Variabilidade Aerobiológica

Observam-se diferenças na composição aerobiológica comparativamente a outras regiões do território nacional. As diferenças encontradas no espectro polínico desta cidade podem ser devidas aos seguintes factores:

- (i) A natureza da paisagem envolvente e a composição florística das respectivas comunidades vegetais;
- (ii) A localização da cidade, propiciada por um clima mais ameno relativamente a outros pontos da ilha, tais como, uma maior exposição solar, com menor precipitação, humidade relativa e intensidade do vento. Uma maior exposição solar favorecendo a maturação e libertação do pólen, e nalguns casos (como em Urticaceae e Poaceae), a sua permanência na atmosfera. Por outro lado, a fraca intensidade do vento parece não favorecer uma dispersão das partículas;
- (iii) Influência dos parâmetros meteorológicos.

A dinâmica da libertação e dispersão das partículas dependem em grande parte do clima, o qual varia de ano para ano. Verificou-se que ocorreu maior número de pólenes quando a

humidade se situou entre os 50 e 60 %, e quando a precipitação e a velocidade do vento atingiram valores mais baixos. Este facto poderá explicar o menor conteúdo polínico em 2002, ano em que a humidade foi superior a 70% e a precipitação mais elevada, comparativamente a 2003 e 2004. A influência negativa da precipitação resulta do efeito de lavagem e sedimentação das partículas atmosféricas (Ribeiro et al, 2003).

Constatou-se a influência da direcção do vento nalguns tipos polínicos, particularmente em Platanaceae. Estas plantas ocorrem na sua maioria a Sudoeste do Funchal, pelo que o vento do quadrante Sudoeste parece ter favorecido o transporte e acumulação deste pólen nas imediações do polinómetro.

(iv) Condicionantes locais e variação intra-diurna

A disposição da cidade num anfiteatro ou enseada montanhosa sobranceira ao mar condiciona a dinâmica intra-diurna das concentrações de pólen:

Por outro lado, dado a direcção predominante do vento de Sudoeste, e o facto do polinómetro se localizar na Sudeste do Funchal, poderá ter promovido o desvio das partículas próximas à área do captador em direcção à montanha.

As correntes convectivas diárias de ar explicam a maior representação do pólen entre as 11 e as 16 horas, altura em que o ar quente transporta em altura um maior número de partículas. Nesse período, as partículas estão simultaneamente sujeitas a correntes de ar mais elevadas, promovendo a dispersão, e conseqüentemente, o aumento da concentração de pólenes. Ao final do dia, o ar quente perde altitude, o que pode explicar novos picos de concentração, observados entre as 20 e as 21 horas. Jones e Harrison (2004) documentaram que o pólen de *taxa* com ciclos de concentração tipicamente diurnos eram também dispersos durante a noite sob condições instáveis, isto é, com humidade relativa baixa e velocidade do vento moderada.

(v) O surgimento de barreira arquitetónicas

Ao longo do estudo foram surgindo várias construções nas imediações do local de captação, vindo a constatar-se uma forte concentração de edifícios, na sua maioria mais altos comparativamente ao ponto de localização do polinómetro. Tal facto poderá ter exercido um efeito de barreira no movimento e captação de pólenes.

2. Análise dos Tipos de Esporos

Agaricus

No período em que foi observado (2003-2004), *Agaricus* evidenciou um carácter perianual e picos de ocorrência em duas épocas distintas do ano: Maio e Dezembro. Se considerarmos que de Maio até Outubro a temperatura manteve-se mais elevada, condicionando a concentração de esporos de *Agaricus*, a análise de correlação reforça a existência de uma correlação negativa entre a concentração deste esporo e a temperatura. Por outro lado, a ocorrência de precipitação poderá ter sido preponderante no período precedente aos picos de concentração, embora a análise a estatística não o demonstre. Apesar da dispersão destes e de outros basidiosporos não depender da precipitação, os corpos de frutificação desenvolvem-se frequentemente em poucos dias após a chuva e sem aumento aparente da temperatura. Como resultado, eleva-se a quantidade de esporos na atmosfera (em Levitin e Horner, 2002).

Os picos de ocorrência intra-diurna de *Agaricus* na atmosfera do Funchal (entre as 03 e as 22 horas), são comparáveis aos observados por Levitin e Horner (2002), que descrevem picos de ocorrência entre as 0 e as 4 horas, os quais surgem com maior expressão após os dias de chuva.

Alternaria

Alternaria está normalmente representada durante todo o ano, com valores de concentração média diária mais elevadas a variar entre os 160 e 320 esporos/m³ de ar em Agosto (Nikkels et al, 1996), valores que ultrapassam, inclusive, a média anual para o Funchal (133 esporos/m³ de ar). Para esta cidade, detectaram-se picos de ocorrência em Maio (2003) e Dezembro (2004). Segundo Platt-Mills e Solomon (1998), os picos são mais frequentes no final do Verão, registando-se, segundo (Corden e Millingt, 2001) os picos de ocorrência entre Julho e Setembro, sobretudo em Agosto.

Para o Funchal, os picos de ocorrência intra-diurna para este esporo, incidiram às 10 e às 13 horas, com uma média de 8 e 9 esporos/m³ de ar, respectivamente. Embora a análise de Spearman não tivesse demonstrado a existência de correlação entre a concentração de esporos de *Alternaria* e os parâmetros meteorológicos para a cidade do Funchal. Tariq et al (1996) referem que os esporos deste fungo atingem os picos de concentração durante o tempo seco. Adicionalmente, e segundo Levitin e Horner (2002), os picos ocorrem no início e meados da tarde, tendo as ocorrências mais baixas no início da manhã. O pico diário ocorre habitualmente quando as temperaturas e a intensidade do vento são elevadas e a humidade é baixa. Entre os meses de Março e Maio de 2003 a velocidade do vento foi mais

expressiva no Funchal relativamente aos outros anos, e o valor da humidade relativa em Maio desse ano atingiu o valor mais baixo, bem como em Dezembro de 2004. Nestas condições, observaram-se os picos de ocorrência de *Alternaria*.

Corden e Millington (2001) verificaram uma correlação positiva entre a concentração de esporos de *Alternaria* e a temperatura máxima, e correlação negativa fraca com a precipitação. Aqueles autores verificaram ainda que as horas picos ocorrem entre as 14 e as 22 horas. Apesar da concentração de *Alternaria* na atmosfera do Funchal não apresentar correlação com nenhum dos parâmetros meteorológicos, a adição de mais anos de observação aerobiológica permitirá definir a acção destas variáveis ambientais. Corden et al (2003) realizaram um estudo aeromicológico comparativo entre as cidades de Cardiff e Derby (Reino Unido). Nesse estudo, constatou-se que a proximidade da costa e a diminuição da área cultivada pode baixar a concentração destes esporos, factores que poderão ser transponíveis para a realidade desta região.

Arthrimum

Os picos de ocorrência deste esporo na atmosfera do Funchal coincidem com os meses de Março a Junho de 2003 e 2004, período em que o vento foi mais intenso. Platt-Mills e Solomon (1998) e Krouse et al (2002), referem nos seus trabalhos que o factor vento constitui a forma de dispersão mais activa deste esporos, observando-se uma correlação positiva com a velocidade do vento. Embora a temperatura mínima pareça exercer uma acção contrária ao aparecimento deste fungo na atmosfera do Funchal, somente a adição de observações dos anos subsequentes a este estudo poderão esclarecer o efeito desta e das restantes variáveis ambientais na ocorrência do fungo.

Botrytis

Em 2004 observou-se a maior expressão do género, ocorrendo 63 esporos/m³ de ar de um total de 72 esporos/m³ de ar obtidos para o período de estudo. Nikkles et al (1996) observaram *Botrytis* durante todo o ano com picos de concentração média diária a variar entre os 160 e 320 esporos/m³ de ar em Agosto e Setembro. Segundo Levitin e Horner (2002), é durante o tempo quente, seco e vento forte, que os esporos deste fungo atingem picos de concentração no início e meados da tarde, tendo as ocorrências mais baixas no início da manhã. O pico diário ocorre habitualmente quando as temperaturas e a intensidade do vento são elevadas e a humidade é baixa. Contudo, da análise de intervalo de confiança do número médio de esporos e do coeficiente de Spearman, constata-se um cenário oposto ao descrito por estes autores.

Cladosporium

Nikkels et al (1996) observaram-no ao longo de todo o ano com concentrações médias diárias nunca inferiores a 40 esporos/m³ de ar. O pico de ocorrência ocorre durante Julho e Agosto com uma concentração média diária que pode variar entre 5000 e 10000 esporos/m³ de ar. Estes valores foram superiores a 50000 nos dias de Verão muito quentes e húmidos. No Funchal, verificou-se uma coincidência semelhante no período de ocorrência principal do fungo, embora em menores concentrações.

Para esta cidade, o pico de ocorrência intra-diurna surgiu às 14 horas, tendo Al-Subai (2002) descrito no seu trabalho um pico regular às 12 horas, durante a tarde e noite. Por seu turno, Peternel et al (2004) verificaram que *Cladosporium spp.* apresentava picos de concentração entre as 10 e 12 horas, e picos mínimos das 06 às 08 horas.

Durante o tempo e seco, os esporos atingem picos de concentração no início e meio da tarde, tendo as ocorrências mais baixas no início da manhã. O pico diário ocorre habitualmente quando as temperaturas e a intensidade do vento são elevadas e a humidade é baixa (Platt-Mills e Solomon, 1998; Levitin e Horner, 2002), facto também observado por nós e suportado pela correlação positiva existente entre a concentração do fungo e a temperatura. Li e Kendrick (1995) observaram uma correlação positiva entre a ocorrência destes esporos e a temperatura entre Maio e Outubro. Por sua vez Sen e Asan (2001), observaram correlação positiva com a temperatura, e negativa, com a humidade. Constatou-se igual correlação, embora fraca, entre este fungo e a humidade relativa.

A precipitação pode constituir um factor limitante, na medida em que condiciona a esporulação do fungo e a sua dispersão. Trata-se de um fungo psicrófilo cujas condições óptimas de crescimento requerem baixas temperaturas, por vezes inferiores a 0°C, limite superior de temperatura de 20°C e humidade relativa de 70% (em Stepalska et al, 1999).

Cladosporium representa o tipo de esporo dominante do conteúdo aerofúngico total, facto igualmente observado por outros autores (Horner et al, 1995; Henríquez et al, 2001; Pepeljnjak e Šegvić, 2003; Jones e Harrison, 2004; Jothish e Nayar, 2004).

Coprinus

Coprinus, bem com outros esporos de cogumelos, representam uma parte significativa da aeromicologia dos períodos noturnos e secos, atingindo valores máximos em regiões com uma cobertura vegetal apreciável (Platt-Mills e Solomon, 1998). Os esporos deste fungo atingem normalmente picos de concentração pelas 8 horas (Levitin e Horner, 2002), obtendo-se esse máximo às 5 horas para a cidade Funchal.

Li e Kendrick (1995) no seu trabalho observaram uma correlação positiva significativa entre a ocorrência destes esporos e a temperatura de Maio a Outubro, período que coincidiu com os valores mais elevados de temperatura na cidade do Funchal. No entanto,

para o nosso caso em particular, a correlação observada foi de sinal negativo para o parâmetro temperatura, e positiva fraca, embora significativa para o vento do quadrante Norte-Noroeste. Como havíamos referido, estes esporos predominam em áreas de floresta, pelo que a emissão destes esporos da floresta sobranceira ao Funchal poderá ser facilitada pela predominância dos ventos de Norte, NE e NW.

Curvularia

Este esporo foi observado na atmosfera do Funchal sobretudo entre Abril e Dezembro. Mezzari et al (2002) observaram-no sobretudo no Outono, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Brasil). Segundo Levitin e Horner (2002) é durante o tempo quente e seco que os esporos deste fungo atingem os picos de concentração no início e meados da tarde, tendo as ocorrências mais baixas no início da manhã. O pico diário ocorre habitualmente quando as temperaturas e a intensidade do vento são elevadas e a humidade é baixa. Neste estudo obtiveram-se correlações positivas significativas com a temperatura, e de sinal negativo, com a direcção do vento, estando em parte, de acordo com as observações de outros autores. Consta-se que o vento direccionado de todo o quadrante Este favorece a incidência deste fungo, pelo que a análise de mais anos poderá confirmar estes dados.

Drechslera

Apesar da análise de correlação de Sperman ser inconclusiva, constata-se que este fungo predomina entre os meses de Abril e Junho e, durante o dia, entre as 12 e as 14 horas. Segundo Levitin e Horner (2002), os esporos deste fungo predominam durante o tempo quente, seco e ventoso, atingindo picos de concentração no início e meados da tarde, tendo as ocorrências mais baixas no início da manhã. Adicionalmente, o pico diário ocorre habitualmente quando as temperaturas e a intensidade do vento são elevadas e a humidade é baixa.

Epicoccum

Comparativamente aos picos de ocorrência deste fungo na atmosfera do Funchal (Maio, e Junho), constata-se no trabalho de Nikkles et al (1996) que o pico máximo de ocorrência surge também em Junho, embora com concentrações médias diárias a variar entre os 40 e os 80 esporos/m³ de ar. A nossa análise de correlação sugere uma influência positiva da temperatura e do vento direccionado de todo o quadrante Este na incidência deste fungo. A dispersão destes esporos aumenta à medida que a velocidade do vento aumenta e a humidade relativa baixa, sendo habitualmente máxima durante os períodos de sol da

tarde, altura em que ocorrem os picos mais elevados de concentração (Levitin e Horner, 2002). Estes picos ocorrem sobretudo nas tardes mais secas, tendo as ocorrências mais baixas no início da manhã (Levitin e Horner, 2002). Henríquez et al (2001) documentaram a presença deste fungo na atmosfera de Santiago (Chile) com uma frequência relativa de 0,5%, tendo sido observado sobretudo no Outono. No Funchal, o contributo dos esporos de *Epicoccum* no conteúdo fúngico global foi de 0,26%.

Fusarium

Os meses de Junho e Julho registaram os valores de humidade relativa mais elevada, período que coincidiu com os picos de concentração do fungo. Entre Outubro e Dezembro, altura em que a precipitação foi mais elevada, ocorreram novos picos de concentração, um comportamento que lhe é típico (Câmara et al, 2001a). *Fusarium* atinge os picos de concentração nos períodos de precipitação, podendo a humidade atmosférica afectar o crescimento e esporulação, bem como a dispersão e conseqüente prevalência dos esporos na atmosfera (Platt-Mills e Solomon, 1998). Num estudo de Sen e Asan (2001) efectuaram-se observações em 5 áreas de cultivo na província de Edirne (Turquia). Estes autores observaram uma correlação negativa com a temperatura e correlação positiva com a velocidade do vento, precipitação e humidade relativa. Neste estudo, observou-se uma correlação negativa entre a ocorrência do fungo e a temperatura média dados que estão em concordância com os verificados por outros autores.

Ganoderma

Os picos de ocorrência deste fungo para o Funchal (entre Maio Outubro) estão em concordância com os observados por Craig e Levetin (2000), que verificaram a ocorrência de picos de concentração dos seus esporos em igual período do ano.

Segundo Craig e Levetin (2000), as condições meteorológicas que antecedem a época de ocorrência máxima podem ter grande significado, nomeadamente a temperatura registada entre os meses de Maio e Junho e a precipitação em Agosto. Há evidências de que estes parâmetros influenciam a expressão e extensão dos níveis de esporos e constituem os requerimentos deste fungo para o seu crescimento ideal num dado substrato.

Li e Kendrick (1995) observaram uma correlação positiva entre a ocorrência destes esporos, a temperatura e a humidade relativa nos meses de Maio a Outubro. No Funchal, durante esses meses, registaram-se valores de temperatura e humidade a rondar os 25 °C e os 60%, respectivamente, período que coincidiu com as concentrações mais elevadas do fungo. A análise de correlação reforça a ideia da influência positiva da temperatura na incidência deste fungo.

Um dos picos de concentração diária observados no Funchal (às 02 horas) é comparável ao documentado por Craig e Levetin (2000), observando-o cerca das 04h. Estes autores registaram os níveis mais baixos às 16 horas. No Funchal, esses níveis foram detectados mais tardiamente, entre as 19 e as 20h.

Gliomastix

Este género representa uma pequena fracção da aerobiologia fúngica da cidade do Funchal, uma vez que este fungo representou 0,09% do total de esporos observados em 2003, e 0,54% em 2004. É de salientar o facto de não se ser observável entre as 14 e as 15 horas e da análise de correlação de Spearman sugerir a existência de uma correlação fraca de sinal negativo entre o fungo e a temperatura. No entanto, e dado a escassez de trabalhos a referenciar a influência das variáveis ambientais na ocorrência deste fungo, a análise aerobiológica continuada poderá definir a acção de cada parâmetro em particular.

Leptosphaeria

A época de crescimento deste fungo está fortemente correlacionada com a precipitação e humidade relativa (Li e Kendrick, 1995). De facto, em Abril de 2003 (onde se registou o pico absoluto de concentração) ocorreu mais precipitação e maior número destes esporos. Li e Kendrick (1995) observaram ainda uma correlação positiva significativa entre a ocorrência dos esporos, a temperatura e a humidade entre os meses de Maio a Outubro. Por outro lado, entre Novembro e Abril, o aparecimento deste esporo parece estar positivamente correlacionado com a humidade relativa e a precipitação. No período de estudo, obtiveram-se correlações positivas entre o fungo, a humidade e o vento direccionado do quadrante Norte-Noroeste. Burge (1986) em Li e Kendrick (1995) verificaram ainda que, durante períodos de chuva, as contagens deste fungo aumentavam substancialmente, estando de acordo com as nossas observações. Este fungo ocorreu ao longo de todo o ano na atmosfera do Funchal, representando 9,29% do total de esporos observados no período de estudo. *Leptosphaeria* representou 6,54% do total de esporos fúngicos observados na atmosfera da cidade de Irakleion (Ilha de Creta) (Gonianakis et al, 2005). Tal como constatado por aqueles autores, este fungo representa também um dos ascosporos predominantes na atmosfera do Funchal.

Lophiostoma

Embora se observe uma correlação negativa fraca entre a ocorrência do fungo e o vento dominante do quadrante Este, somente uma análise aerobiológica continuada poderá

definir a acção de cada parâmetro em particular. Tal nos permitirá retirar ilações acerca do modo de ocorrência anual e intra-diurna deste fungo.

Nigrospora

Este fungo apresentou uma correlação positiva com a temperatura, ocorrendo sobretudo nos meses mais quentes (Maio-Setembro). Mezzari et al (2002) observaram uma maior incidência deste esporo no Verão. O facto dos picos de ocorrência do fungo na atmosfera do Funchal terem surgido entre as 11 e 16 horas, tal poderá dever-se ao mecanismo de activo de dispersão dos seus esporos, não requerendo vento para tal (Platt-Mills e Solomon, 1998) mas sim humidade para a libertação dos esporos (Bisht et al, 2003).

Periconia

O fungo surgiu essencialmente nos meses de Março, Maio e Dezembro de 2004, coincidindo com os períodos de maior precipitação, a par de uma humidade relativa na ordem dos 60%. Embora a análise de correlação não seja conclusiva, os parâmetros meteorológicos atrás referidos parecem ter exercido uma maior influência na concentração do fungo.

Pleospora

O fungo surgiu com maior expressão em 2003, atingindo picos de concentração após os meses de maior precipitação (Abril e Outubro). Em 2004, tais picos coincidiram com os meses de maior precipitação, dados que sugerem uma influência importante deste parâmetro meteorológico no modo de dispersão do fungo.

Polythrincium

Embora nenhum dos parâmetros meteorológicos apresente correlação com a concentração deste fungo, no trabalho de Li e Kendrick (1995) é descrita uma correlação positiva entre a ocorrência deste fungo, a temperatura e a humidade entre Maio e Outubro. Como havia sido referido, durante esses meses, a temperatura na cidade do Funchal rondou os 25 °C e a humidade os 60%, período que coincidiu com as concentrações mais elevadas do fungo. Nikkels et al (1996) observaram as concentrações mais elevadas de *Polythrincium* no final do Verão, sobretudo entre Julho e Outubro.

Puccinia

Do carácter perianual evidenciando por este fungo na atmosfera do Funchal, ressalta-se as baixas concentrações verificadas em Janeiro e Fevereiro. No trabalho de Jothish e Nayar (2004) efectuado em Kerala (Índia), não foram observados uredosporos naqueles meses, nem constatado um carácter perianual.

À semelhança de outros *taxa*, a incidência destes esporos poderá ser maior se o vento soprar de Este, favorecendo a dispersão de fungos que ocorrem nas áreas agrícolas e/ou de terrenos baldios situados a Este do Funchal. Savery (1986) em Jones e Harrison (2004) verificaram que as concentrações de uredosporos de *Puccinia spp.* dependiam do grau de infecção da semente hospedeira e das condições meteorológicas, pois em dias secos as concentrações aumentavam com o aumento da temperatura, e intensidade do vento e humidade relativa reduzidas. Este autor observou que os picos de concentração ocorriam por volta das 12 horas, ou 2 a 3 horas mais tarde nos dias mais frios e húmidos. Atendendo à variação intra-diurna deste fungo na atmosfera do Funchal (com picos de ocorrência entre as 13 e as 17 horas), a meteorologia observada durante o período de estudo e o seu carácter patogénico, é de considerar que as condições descritas por aquele autor também se apliquem neste caso.

Sordaria

Tendo a análise de correlação de Spearman sugerido a existência de uma correlação negativa entre a ocorrência deste fungo e um único parâmetro, a temperatura, verificou-se que o aparecimento deste fungo na atmosfera do Funchal coincidiu com os meses em que ocorreu precipitação. Dado a escassez de trabalhos que referenciam a influência das variáveis ambientais sobre a ocorrência deste fungo, a análise aerobiológica continuada poderá definir a acção de cada parâmetro em particular.

Spegazzinia

O período em que as concentrações do fungo foram mais elevadas (Maio-Agosto de 2003) coincidiu com a ausência de precipitação. Além da precipitação, a humidade pode constituir outro factor importante, na medida em que ao diminuir a humidade relativa verifica-se um aumento da concentração de esporos deste fungo.

Stemphylium

O aparecimento deste fungo ocorreu, regra geral, nos meses em que houve precipitação. Num dos picos de ocorrência observados em Junho de 2003 e de 2004 não ocorreu

precipitação para além da humidade relativa ter sido a mais elevada, dados que estão de acordo com os pressupostos de Prados-Ligero et al (2003). Segundo estes autores, a precipitação parece estar directamente relacionada com a concentração atmosférica dos ascosporos e conídios. Por outro lado, verificaram que o papel da humidade relativa torna-se essencial quando há precipitação. Observaram ainda, que a libertação destes ascosporos ocorria sobretudo em Fevereiro e Março, coincidindo com períodos de chuva. Nikkles et al (1996) e Waisel et al (2004) verificaram que *Stemphylium* atinge as concentrações mais elevadas no Verão.

Tetraploa

Para este fungo os factores que parecem influenciar a dinâmica de dispersão prendem-se com a sua ecologia e interacção com os factores meteorológicos, nomeadamente a direcção e intensidade do vento. Face a baixa representação dos esporos de *Tetraploa* na atmosfera do Funchal, a análise aerobiológica continuada permitirá definir a acção das variáveis ambientais na sua dinâmica de dispersão.

Torula

Os picos de ocorrência de *Torula* na atmosfera do Funchal surgiram entre Maio e Junho. Nikkels et al (1996) descrevem-no a atingir as concentrações mais elevadas no final do Verão, particularmente entre Julho e Outubro. No estudo realizado por Gonzalo et al (1996) na cidade de Badajoz (Espanha) (sendo Julho o mês mais quente, com temperaturas máximas de 34°C e mínimas de 17,8°C), concluiu-se que as temperaturas mais elevadas e um menor índice de precipitações favoreciam a presença de *Torula* na atmosfera. Factores como a ecologia e interacção com os factores meteorológicos apontados para *Tetraploa* poderão explicar a dinâmica de dispersão deste fungo.

Venturia

A par da meteorologia observada em 2003, verifica-se que os picos de concentração deste fungo coincidiram com os meses de maior precipitação no Funchal (Abril e Outubro). Da mesma forma, em Maio 2004 registou-se um dos picos de concentração do fungo num período de maior precipitação. Por outro lado, o pico de concentração máxima de esporos deste fungo atingido em Junho de 2003 foi coincidente com uma humidade relativa superior a 70%. Ghosh et al (2004) observaram uma correlação significativa entre a concentração de fungos e a humidade, constituindo a variável que mais influencia o crescimento dos fungos, sobretudo quando excede os 65% (Platts-Mills e Solomon, 1989). Villalta et al (2001) verificaram que a grande maioria destes ascosporos ocorrem durante o

dia (6-18 horas). No Funchal, os picos de ocorrência surgiram entre as 10 e as 16 horas. Segundo aquele autor, os que ocorrem durante a noite, no período (19 e 5 horas) surgem preferencialmente entre a 1 e as 3 horas.

Xylaria

Representa outro exemplo de fungo com baixa representação na atmosfera do Funchal e cuja análise de correlação é de momento inconclusiva. Dado se ter observado picos de concentração nos meses em que ocorreu precipitação, esta variável ambiental poderá ser a influente na distribuição do fungo, à semelhança do que acontece com outros ascomicetes.

Esporos de Fetos

Os fetos constituem uma presença habitual na cidade Funchal, pese embora os esporos de fetos totalizem 1,94 % do total das observações aerobiológicas. Os esporos de fetos são raramente identificados nos estudos aerobiológicos, pelo que são referenciados esporadicamente na literatura. São produzidos em elevado número, contudo, por serem partículas grandes e pesadas, atingem com dificuldade as camadas mais elevadas da atmosfera. Os fetos aparecem normalmente na camada herbácea da floresta, pois a camada folhosa arbórea não permite a livre passagem dos esporos (Kasprzyk, 2004). Caulton et al (2000) observaram para uma área urbana de Edimburgo (Escócia), que a valores mais elevados de temperatura média se associavam concentrações elevadas de esporos de *Pteridium aquilinum*. Constatou-se o mesmo grau de associação para os géneros *Pteridium* e *Polypodium* detectados na atmosfera do Funchal.

2.1. Total Anual de Fungos

Durante o período de estudo foram observados esporos de fungos sobretudo na Primavera, início do Verão e no Outono. O período de Maio a Outubro corresponde à estação favorável ao crescimento dos fungos e às condições de dispersão mais propícias no "outdoor", pelo que o número e biodiversidade de fungos são maiores (Li e Kendrick, 1996; Pepeljnjak e Šegvić, 2003). No Verão em particular, a concentração de fungos reduz-se com o aumento da temperatura e diminuição da humidade relativa, condições menos favoráveis ao crescimento dos fungos (Satheesh e Rao, 1994).

2.2. Ocorrência das Classes Predominantes

Os Deuteromicetes são a classe predominante na atmosfera do Funchal. Segundo Levetin e Horner (2002), constituem um grupo extremamente bem sucedido e mais abundante no ambiente.

Os esporos de Basidiomicetes são igualmente abundantes em muitas partes do mundo, representando entre 5 a 60% do conteúdo aeromicológico total (Helbling et al, 2002). Nas zonas temperadas, os picos sazonais dos basidiosporos têm lugar na Primavera e Outono, coincidindo com os períodos principais de frutificação dos cogumelos. Contudo, alguns basidiosporos estão normalmente presentes em qualquer altura do ano com temperaturas e humidade adequadas. Tal como os basidiosporos, os Ascomicetes são activamente libertados quando a humidade é elevada (Levetin e Horner, 2002).

2.3. O Esporo de Fungo Predominante

Cladosporium constitui o fungo mais abundante na atmosfera do Funchal. Este esporo é um dos mais abundantes e cosmopolitas na maioria dos ambientes do "outdoor" (Satheesh e Rao, 1994; Stepalska, et al, 1999; Khandelwal, 2001; Jothish e Nayar, 2004). Kurkula (1997) em Jones e Harrison (2004) constatou que as suas concentrações mais elevadas ocorrem a humidades relativas de 40 a 70%, valores aliás, típicos na cidade do Funchal.

2.4. Meteorologia versus Concentração de Esporos de Fungos

O efeito dos diferentes factores meteorológicos varia com a estação, sendo que em geral, os valores médios considerados mais importantes do que os valores máximos e mínimos (Jones e Harrison, 2004). Vários estudos têm demonstrado que as estimativas dos fungos na atmosfera alteram-se não só de estação para estação e de dia para dia, mas também de hora a hora (Al-

Subai, 2002). Outro dado a ter em conta é o facto dos esporos responderem de forma diversa às condições ambientais (Levetin e Horner, 2002).

2.4.1. Variação Diária da Concentração de Esporos de Fungos

Os ritmos circadianos de temperatura, humidade, intensidade e direcção do vento interagem frequentemente na dinâmica do conteúdo aeromicológico (nomeadamente nos Deuteromicetes e Uredosporos), e no padrão nocturno típico dos Ascosporos e os Basidiósporos (Platts-Mills e Solomon, 1998). De uma forma geral, o pico de incidência de esporos no ar ocorre durante as horas mais quentes do dia e diminui no entardecer (Krouse et al, 2002).

2.4.2. Efeito das Variáveis Meteorológicas

Entre 2002 e 2004, a **temperatura** na cidade do Funchal variou entre os 15 e os 25 °C, e, embora a **precipitação** seguisse um padrão normal para a região, à excepção do 1º semestre de 2004 que foi muito baixa, 2003 foi um ano caracterizado por um 1º semestre mais ventoso e com a **humidade** a variar entre os 60 e os 70%. São as condições, segundo Pepeljnjak e Šegvić (2003), consideradas as mais importantes para a ocorrência de fungos na atmosfera.

Ghosh et al (2004) observaram uma correlação significativa entre a concentração de fungos e a humidade. Esta constitui a variável que mais influencia o crescimento dos fungos, sobretudo quando excede os 65% (Platts-Mills e Solomon, 1989). Muitos Ascosporos e Basidiosporos são libertados dos seus pontos de origem por processos que requerem água, daí se observarem concentrações mais elevadas destes esporos após períodos de chuva ou nevoeiro. A sua libertação depende frequentemente da actividade de células túrgidas que requerem um suplemento de água para a ejeção das partículas. Além da humidade ambiente, a emissão de esporos depende também do material disponível no ponto de origem e do crescimento entretanto ocorrido (Jones e Harrison, 2004).

Para outros fungos, a unidade reprodutiva está dependente da acção do vento, uma vez que a dispersão dos esporos aumenta com a intensidade do vento e diminuição da humidade relativa. É o caso de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum* e dos Uredosporos.

Uma vez produzidos, os esporos dos Deuteromicetes são geralmente superiores quando a velocidade do vento é mínima, verificando-se uma correlação positiva entre a ocorrência destes fungos e a temperatura.

Para os Basidiomicetes, a precipitação foi considerada como a variável mais importante correlacionada com a concentração dos esporos (Jones e Harrison, 2004). Nos Ascomicetes, a velocidade do vento e humidade mínimas estão relacionadas com as concentrações dos esporos.

2.5. Variáveis Meteorológicas e Mecanismos de Dispersão dos Esporos de Fungos

Na maioria das classes de fungos são conhecidos os efeitos das variáveis meteorológicas nos processos de libertação de esporos para a atmosfera. Se considerarmos um esporo uma partícula inerte numa dada superfície, a sua remoção irá depender do balanço entre duas forças:

- (i) forças de coesão, por exemplo, electrostáticas, se a partícula e a superfície têm carga diferente.
- (ii) forças de tensão, caso a superfície seja húmida, provocando a retenção da partícula na superfície.

A remoção e movimento da partícula requerem a acção de forças externas, tais como o vento, impacto da chuva ou outro distúrbio físico, e que cujas forças sejam superiores às que mantêm a partícula numa superfície. Por outro lado, a radiação solar pode também estimular a libertação dos esporos. Jones e Harrison (2004) constataram que esporos de *Cladosporium* têm uma maior libertação para a atmosfera quando a superfície se torna seca, a tensão superficial baixa, e o vento aumenta de intensidade, facilitando a aerosolização. Foi constatado que ocorria a libertação de um maior número de conídios de *Alternaria alternata* com a redução da humidade relativa (Jones e Harrison, 2004). Em suma, a diminuição da humidade ambiente, e/ou aumento da radiação infra-vermelha e visível, reduz a humidade do microambiente onde assentam as partículas e/ou promovendo a evaporação da água na superfície. As alterações da humidade e da radiação solar poderão afectar a carga eléctrica de uma dada superfície, com conseqüente aumento em carga, correlacionando-se a uma libertação massiva de esporos (Jones e Harrison, 2004).

2.6. Vegetação Circundante

A vegetação circundante afecta a aeromicrobiologia local: em geral, as regiões temperadas e cultivadas são fontes habituais de esporos de *Alternaria*, *Cladoporium*, *Drechslera* e *Epicoccum*. No caso particular do Funchal, por entre a malha urbana surgem pequenas áreas de cultivo, nomeadamente zonas hortícolas e de pomar e uma variedade apreciável de espécies vegetais que servem de hospedeiro a muitos fungos. As plantas herbáceas são uma das fontes mais importantes de esporos de fungos (Jones e Harrison, 2004). As gramíneas, por exemplo, proliferam em quantidade e variedade ao longo de todo o ano, constituindo um substrato importante para o crescimento de fungos, nomeadamente de Deuteromicetes (Satheesh e Rao, 1994). Por seu lado, a proximidade da floresta Laurissilva no limite superior da cidade do Funchal, permite a emissão de esporos de basidiosporos, tais como, *Agaricus*, *Coprinus* e *Ganoderma*, característicos de áreas de floresta.

2.7. A Correlação entre Esporos de Fungos e Pólenes

Tem sido documentada a relação entre a vegetação circundante, os aerossóis vegetais, os pólenes e esporos (Roos, 1996). Constatou-se a existência de correlação entre a ocorrência de alguns fungos e taxa polínicos mais frequentes na atmosfera do Funchal. Dado a ampla dispersão de *Parietaria* e de outras gramíneas que servem de hospedeiro a fungos, é provável que haja uma relação entre aqueles pólenes e a ocorrência de esporos/conídios de maior dimensão, tais como de *Alternaria* e *Drechslera*, que são comuns a alturas baixas. Tal poderá dever-se à menor capacidade de flutuação dos esporos/conídios de maiores dimensões ao invés dos esporos mais pequenos que mostram maior facilidade de dispersão em altura (Chakraborty et al, 2001). Para além da dimensão, a microestrutura e a acção de parâmetros meteorológicos, como a temperatura e a pressão, podem afectar o comportamento das partículas (Teptin e Douraguine, 1996). Uma vez na atmosfera, os pólenes respondem aos mesmos processos de dispersão que afectam os esporos (Krouse et al, 2002).

2.8. A proporção de Esporos de Fungos e Pólenes

Os esporos de fungos constituem uma fracção significativa das partículas na atmosfera do Funchal, sendo cerca de 11 vezes superior à dos pólenes, proporção essa observada no Funchal (10,9 vezes). Na Primavera, os níveis de esporos aumentam com a chegada dos dias mais quentes, coincidindo na maior parte das vezes, com a época de polinização das plantas (Krouse et al, 2002). Durante o Verão, a quantidade de esporos que ocorre na atmosfera pode ultrapassar a dos pólenes, numa razão aproximada de 1000:1 (Krouse et al, 2002). Apesar da desproporção, apenas alguns fungos foram responsabilizados como os principais causadores de alergia (Loureiro, 2001; Adhikari et al, 2004). Em geral, a proporção em volume de aerossóis composto por partículas biológicas é de 10% em ambientes marítimos, e superior a 20% num território continental (Jones e Harrison, 2004). A título de exemplo, a zona costeira mediterrânica apresenta concentrações polínicas mais baixas, comparativamente ao território continental (Belmonte et al 1995; Subiza, 2003).

CONCLUSÃO

Os esporos de fungos estão presentes na atmosfera ao longo de todo o ano, sobretudo na Primavera, início do Verão, e no Outono.

- A maior incidência de esporos de fungos ocorre nos meses de Abril e Maio.
- As classes predominantes de fungos são por ordem decrescente: Deuteromicetes, Ascomicetes e Basidiomicetes.
- *Cladosporium* foi o fungo mais observado na atmosfera e o predominante na classe dos Deuteromicetes.
- Ao longo do dia os esporos de fungos ocorreram em maior concentração entre as 13 e as 15 horas, surgindo igualmente nas primeiras horas da madrugada e da noite.
- Os Deuteromicetes predominam durante a tarde. Os Ascomicetes e os Basidiomicetes foram observados sobretudo na madrugada, atingindo as concentrações mais baixas entre as 8 e as 9 horas, vindo depois a aumentar no fim da tarde-início da noite.
- A humidade relativa representa a variável ambiental que mais influencia no aparecimento de um maior número de fungos, particularmente entre os 60 e os 70%.
- Os esporos de fungos e os pólenes apresentam uma dinâmica de variação semelhante entre Março e Julho.
- A aplicação do teste de Spearman ao conjunto de dados aerobiológicos obtidos neste estudo permitiu antever a influência das variáveis ambientais em cada tipo particular de pólen e de fungo.
- A análise de Spearman sugere a existência de correlação entre o aparecimento de alguns tipos de esporos de fungos e de pólenes, nomeadamente de *Parietaria* e de outras gramíneas, com a ocorrência de *Alternaria* e *Drechslera*.
- A direcção do vento parece favorecer a dispersão e incidência de esporos, particularmente os derivados de áreas de cultivo, de zonas de ocorrência de gramíneas ou de áreas de floresta.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A primeira parte do trabalho apresentado nesta tese consistiu na caracterização da composição aerobiológica da atmosfera da cidade do Funchal de 2002 a 2004. Em seguida, ressaltam-se os principais pontos a ter em consideração no trabalho futuro:

1. Monitorização Aerobiológica Local

O trabalho por nós iniciado representa um contributo para o conhecimento do conteúdo aerobiológico da atmosfera do Funchal, tendo particular interesse no domínio alergológico. Um dos pressupostos a seguir é estabelecer uma vigilância aerobiológica continuada que revele quais os aeroalergénios mais frequentes na atmosfera. Tal permitirá a elaboração de calendários da ocorrência de pólenes e esporos de fungos para esta região. Nesta sequência surgem novas possibilidades para o doente alérgico, nomeadamente:

- (a) na adopção de medidas e tratamentos preventivos;
- (b) no controlo e seguimento da polinose;
- (c) na adequação dos extractos utilizados para a realização dos testes cutâneos.;
- (d) na interpretação das manifestações sintomatológicas por parte dos médicos assistentes.
- (e) na interpretação da prevalência de sensibilizações múltiplas da população sensibilizada;

Este estudo também revelou a presença de aeroalergénios fora dos períodos de floração facto que poderá explicar a discordância entre os períodos de polinização principal e os sintomas alérgicos.

Neste sentido, seria interessante realizar observações *in locu* na altura da floração das plantas alvo, e determinar quais os *taxa* cuja floração passou a ser mais precoce. Em última análise, a produção de pólen é considerado um indicador sensível da reacção da planta às alterações do clima. Essas alterações, repercutem-se na distribuição das plantas, e portanto, na distribuição polínica da atmosfera. Por seu turno, as alterações na ecologia vegetal provocam alterações na aeromicologia, pois os materiais vegetais representam o substrato primário dos fungos.

2. Ambiente "outdoor" e "indoor"

Alguns estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado uma relação directa entre os níveis de esporos e os sintomas da alergia respiratória, primariamente a asma. Os sintomas têm sido correlacionados com a exposição "outdoor" aos esporos de *Alternaria*,

Cladosporium ou de Basidiomicetes. Apesar da necessidade de haver mais investigação neste âmbito, estes estudos ilustram a importância dos esporos de fungos, quer de ambientes "indoor" e "outdoor", como agentes etiológicos da doença alérgica.

No seguimento deste estudo, fará todo o sentido incluir no boletim polínico do Funchal, os níveis de esporos de fungos mais frequentes nesta cidade, pelas razões apontadas nas alíneas a-e do ponto 1. O conhecimento da aeromicrologia local tem-se mostrado útil em trabalhos de investigação no âmbito do ambiente "indoor" nesta região. Tal permite-nos, por exemplo, estabelecer comparações entre o conteúdo aeromicológico de ambos os ambientes ("indoor" e "outdoor") e revelar os tipos de esporos com capacidade alergizante.

Relativamente a outro dos objectivos propostos, com o qual se pretendia estabelecer um modelo preditivo de ocorrência das partículas, apontamos novas orientações de trabalho que ajudarão na sua concretização:

3. Aerobiologia Predictiva

Devido às constantes alterações das concentrações atmosféricas dos bioaerossóis e ao tempo envolvido na análise das amostras de ar, far-se-á cada vez mais a transição da Aerobiologia *Descritiva* para a Aerobiologia *Predictiva*. Os modelos de previsão poderão elucidar a dinâmica da variação polínica se incluídos uma sequência de anos.

A análise de coeficientes de correlação efectuada servirá à partida para definir os parâmetros ambientais que mais influenciam a dinâmica das concentrações de pólenes e esporos de fungos na atmosfera, e uma referência para a concepção de um modelo preditivo para esta região. Futuramente será de incluir novos parâmetros que ajudem a explicar o comportamento destas partículas e a aplicação de métodos de previsão, tais como a análise de regressão, que correlacionam os parâmetros meteorológicos com as concentrações de pólenes, e sua variação em determinadas sequências de tempo. Resultará igualmente interessante incluir a fenologia da área de estudo, para além das variáveis meteorológicas.

Os métodos de previsão a aplicar aos esporos fúngicos permitirão definir os seus padrões de distribuição anual e estimar os períodos de maior ocorrência. Tal possibilitaria estimar os períodos potenciais de infecção de agentes fitopatogénicos, tais como as ferrugens.

4. Monitorização a Larga Escala Espaço-Temporal

Acresce o interesse em estender este estudo à monitorização de bioaerossóis à larga escala. O Arquipélago da Madeira está particularmente sujeito a episódios de *bruma* ou massas de ar vindas das poeiras do deserto de África. Em 2003, surgiu a Unidade de Oceanografia e Teledetecção Aplicada no Centro de Estudos da Macaronésia da Universidade da Madeira. Um dos seus objectivos consiste na concepção de modelos de previsão e de análise de aerossóis, particularmente os que atingem o nosso Arquipélago. Tal permitirá definir o tipo e o grau de contaminantes transportados e suas implicações a nível local. As novas tecnologias correntes de monitorização, permitem aumentar a precisão dos estudos aerobiológicos, investigando a dinâmica da população de organismos que se movimentam a longa distância, permitindo-nos estimar a sua quantidade e trajectória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu I, Ribeiro H e Cunha M (2003) An Aeropalynological study of the Porto region (Portugal). *Aerobiologia* **19**: 235–241.
- Adhikari A, Sen MM, Gupta-Bhattacharya S e Chanda S (2004) Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environment International* **29**: 1071-1078.
- Aira MJ, Dopazo A e Jato MV (2001) Aerobiological monitoring of Cupressaceae pollen in Santiago de Compostela (NW Iberian Peninsula) over six years. *Aerobiologia* **17**: 319–325.
- Al-Subai AAT (2002) Air-borne fungi at Doha, Qatar. *Aerobiologia* **18**: 175–183.
- Arruda CMF, Marchini LC, Moreti ACCC, Otsuk IP e Sodré GS (2005) Características físico-químicas de méis da Chapada do Araripe/Santana do Cariri-Ceará. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 27 (**1**): 171-176.
- Arshad SH (2003) Epidemiology and the prevention of Allergy In *The Year in Allergy – 2003*, pp. 3-5. [Eds. Holgate ST and Arshad SH], Clinical Publishing Services. Oxford.
- Bedinger P (1992) The Remarkable Biology of Pollen. *Plant Cell* **4**:879-887.
- Behrendt H e Becker W.-M (2001) Localization, release and bioavailability of pollen allergens, the influence of environmental factors. *Current Opinion in Immunology* **13**: 709-715.
- Belmonte J, Canela M e Guàrdia R-A (2000) Comparison between categorical pollen data obtained by Hirst and Cour sampling methods. *Aerobiologia* **16**: 177–185.
- Belmonte J, Roure JM e Franch J (1995) Aerobiologia de Balears Ciutat de Mallorca, Mao e Ciutadella. *Revista Espanhola de Aerobiologia* **1**: 65-73.
- Bhattacharya A, Monda S e Sudhendu M (1999) Entomophilous pollen incidence with reference to atmospheric dispersal in eastern Índia. *Aerobiologia* **15**: 311–315.
- Bisht V, Kukreja N, Singh BP, Arora N e Sridhara S (2003) Current Status of Fungal Allergens. *Indian J Allergy Asthma Immunol.* 17(**1**) : 9-19.
- Blackmore S e Knox RB (1990) *Microspore, Evolution and Ontogeny*. Academic Press London.
- Brandão JM (1991) *Geologia do Arquipélago da Madeira*. 1ª Ed. Museu Nacional de História Natural.
- Brandão R (2004) Sampling Techniques for Bioaerosols. Summer Course 2004 Aerobiology and Environment, Madeira, Funchal, Abstracts Book.

- Brandão RM e Lopes ML (1990) O Ambiente Aeropalínológico e as Alergias Respiratórias na Região de Évora. *Actas da II Conferência Nacional da Qualidade do Ambiente*, Lisboa.
- Brandão RM, Lopes ML e Caeiro E (2004) A Rede Portuguesa de Aerobiologia. 8ª Conferência Nacional de Ambiente, 27-29 Outubro 2004, Centro Cultural de Belém.
- Burge HA (2002) An update on pollen and fungal spore aerobiology. *J Allergy Clin Immunol.* 110 (4): 544-552.
- Burge HA e Solomon WR (1987) Sampling and analysis of biological aerosols. *Atmos. Environm.* **21**: 451-456.
- Busquet J, Ansotegui IJ, van Ree R, Burney PG, Zuberbier T e van Cauwenberge P (2004) European Union meets the challenge of the growing importance of allergy and asthma in Europe. *Allergy* **58**: 1-4.
- Caiola MG, Mazzitelli A, Capucci E e Travaglini A (2002) Monitoring pollinosis and airborne pollen in a Rome university. *Aerobiologia* **18**: 267-275.
- Câmara R, Câmara I, Oliveira S, Carvalho MÂ e Drummond Borges F (2001a) Estudo dos Fungos no Ar da Cidade do Funchal – Prevalência da Atopia a Fungos na Consulta de Imunoalergologia do C.H.F. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* (9) **2**: 137.
- Câmara R, Câmara I, Oliveira S, Carvalho MÂ e Drummond Borges F (2001b) Prevalência de Sensibilização a Pólenes em Doentes com Rinite da Consulta de Imunoalergologia do C.H.F. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* (9) **2**:176.
- Cariñanos P, Emberin J, Galán C e Domínguez-Vilches E (2000) Comparison of pollen counting methods of slides from a hirst type volumetric trap. *Aerobiologia* **16**: 339-346.
- Casas C (1995) Imunocitoquímica de granos de polen de *Parietaria judaica* L. Relatório de estágio apresentado na Facultat de Farmàcia, Laboratorio de Botànica, Universitat de Barcelona.
- Caulton E, Keddie S, Carmichael R e Sales J (2000) A ten year study of the incidence of spores of bracken, (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.) in an urban rooftop airstream in south east Scotland. *Aerobiologia* **16**: 29-33.
- Chakraborty P, Gupta-Bhattacharya S, Chowdhury I, Majumdar MR e Chanda S (2001) Differences in concentrations of allergenic pollens and spores at different heights on an agricultural farm in west Bengal, India. *Ann Agric Environ Med* **8**: 123-130.
- Chazette P, Pelon J, Moulin C, Dulac F, Carrasco I, Guelle W, Bousquet P e Flamant P-H (2001) Lidar and satellite retrieval of dust aerosols over the Azores during SOFIA/ASTEX. *Atmospheric Environment* **35**: 4297-4304.

- Chehregani AM, Moin M, Gholami M, Kohno S, Nabe T e Shariatzade MA (2004) The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains. *Aerobiologia* **20**: 111–118.
- Ciancianaini P, Albertini R, Pinelli S, Lunghi P, Ridolo E e Dall'Aglio P (2000) *Betulaceae, Corylaceae, Cupressaceae, Fagaceae* and *Salicaceae* around Parma (Northern Italy), Pollen calendars from 1995 to 1997. *Aerobiologia* **16**: 309-312.
- Clode MM, Thibaudon A, Cruz AT, Pereira-Barbosa MA e Palma-Carlos AG (1992) Aerobiological Survey of Pollens in Lisbon (preliminary data). *Allergie & Immunologie XXIV (2)*: 65.
- Corden JM e Millingt WM (2001). The long-term trends and seasonal variation of the aeroallergen *Alternaria* in Derby, UK. *Aerobiologia* **17**: 127–136.
- Corden JM, Millington WM e Mullins J (2003) Long-term trends and regional variation in the aeroallergen *Alternaria* in Cardiff and Derby UK – are differences in climate and cereal production having an effect? *Aerobiologia* **19**: 191–199.
- Craig LC e Levetin E (2000) Multi-year of *Ganoderma* aerobiology. *Aerobiologia* **16**: 75-81.
- D'Amato G (1998) Pollen Allergy in the Mediterranean Area. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* **6 (2)**: 96-98.
- D'Amato G e Liccardi G (1994) Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clinical and Experimental Allergy* **24**: 210-219.
- D'Amato G e Liccardi G (2002) The increasing trend of seasonal respiratory allergy in urban areas. *Allergy* **57 (Suppl. 71)**: 35-36.
- D'Amato G e Spieksma FThM (1992) European allergenic pollen types. *Aerobiologia* **8**: 447-450.
- Dahl A e Strandhede S-O (1996) Predicting the intensity of birch pollen season. *Aerobiologia* **15**: 97-106.
- Deacon JW (1984) *Introduction to Modern Mycology*. 2nd Ed. Blackwell Scientific Publications.
- Detandt M e Nolard N (2000) The fluctuations of the allergenic pollen content of the air in Brussels (1982 to 1997). *Aerobiologia* **16**: 55–61.
- Eigenmann PA (2005) Diagnosis of allergy syndromes, do symptoms always mean allergy? *Allergy* **60 (Suppl. 79)**: 6-9.
- Emberlin JC (1997) Grass, tree and weed pollens In *Allergy and allergic diseases*. [Ed. Kay AB, vol. 2: 837-838.] Blackwell Science. Oxford.
- Faegri K e Iversen J (1989) *Textbook of Pollen Analysis*. 4th Ed. John and Wiley & Sons Ltd.
- Frenguelli G (1998) The contribution of aerobiology to agriculture. *Aerobiologia* **14**: 95-100.

- Frenguelli G e Mandrioli P (1990) Airborne pollen monitoring in Italy. *Review of Paleobotany and Palynology* **64**: 41-43.
- Fuzzi S, Mandrioli P e Perfetto A (1997) Fog droplets – an atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment* 31 (**2**): 287-290.
- Gabarra E, Belmonte J e Canela M (2002) Aerobiological behaviour of *Platanus* L. pollen in Catalonia (North-East Spain). *Aerobiologia* **18**: 185–193.
- Gage SH, Isard SA e Colunga-G M (1999) Ecological scaling of aerobiological dispersal processes. *Agricultural and Forest Meteorology* **97**: 249-261.
- Galán C, García-Mozo H, Cariñanos P, Alcázar P e Domínguez-Vilches E (2001a) The role of temperature in the onset of the *Olea europaea* L. pollen season in southwestern Spain. *International Journal Biometeorol.* **45**: 8-12.
- Galán C, Cariñanos P, García-Mozo H, Alcázar P e Domínguez-Vilches E (2001b) Model for forecasting *Olea europaea* L. airborne pollen in South-West Andalusia, Spain. *International Journal Biometeorol.* **45**: 59-63.
- Galán C, Vásquez L, García-Mozo H e Domínguez E (2004) forecasting olive (*Olea europaea*) crop yield based on pollen emission. *Field Crops Research* **86**: 43-51.
- Gehrig R e Peeters AG (2000) Pollen distribution at elevations above 1000 m in Switzerland. *Aerobiologia* **16**: 69–74
- Ghosh N, Camacho R, Saadeh C, Gaylor M e Smith DW (2004) Study on the fungal aeroallergen concentration in the Texas Panhandle using a Burkard Volumetric Spore Trap. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (**2**) (Suppl. 1): S91.
- Giner MM e García S (2002) Allergenic pollens in south-east Spain. *Allergy* **57**: 59-60.
- Giner MM Garcia JSC e Camacho CN (2002) Seasonal fluctuations of the airborne pollen spectrum in Murcia (SE Spain). *Aerobiologia* 18: 141–151.
- Giorato M, Lorenzoni F, Bordin A, Biasi G, Gemignani C, Schiappoli M e Marcer G (2000) Airborne allergenic pollens in Padua: 1991–1996. *Aerobiologia* **16**: 453–454.
- Gonianakis M, Neonakis I, Darivianaki E, Gonianakis I, Bouros D e Kontou-Fili K (2005) Airborne Ascomycotina on the island of Crete: Seasonal patterns based on an 8-year volumetric survey. *Aerobiologia* **21**: 69–74.
- Gonzalo MA, Martínez JF, Muñoz AF, Paredes MM e Silva I (1996) Estudio aeromicológico de la ciudad de Badajoz, Periodos de mayo a agosto de 1993 y 1994. *Revista Española de Alergología y Inmunología Clínica* **4**: 188-194.
- Graça MF (2003) Epidemiologia e factores de risco. Asma brônquica na prática clínica. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* 11 (**1**): 7-27.
- Green BJ, Yli-Panula E, Dettmann M, Rutherford S e Simpson R (2003) Airborne *Pinus* pollen in the atmosphere of Brisbane, Australian relationships with meteorological parameters. *Aerobiologia* **19**: 47–55.

- Griffin DW, Garrison VH, Herman JR e Shinn EA (2001) African desert dust in the Caribbean atmosphere, Microbiology and public health. *Aerobiologia* **17**: 203–213.
- Griffin DW, Kellogg CA, Garrison VH, Lisle JT, Borden TC e Shinn EA (2003) Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust events. *Aerobiologia* **19**: 143–157.
- Griffiths WD e Stewart IW (1999) Performance of bioaerosol samplers used by de UK Biotechnology Industry. *Journal of Aerosol Science* 30 (**8**): 1029-1040.
- Grinshpun SA, Willeke K, Ulevicius V, Donnelly J, Lin X e Mainelis G (1996) Collection of airborne microorganisms, advantages and disadvantages of different methods. *Journal of Aerosol Science* 27 (**1001**): 247-248.
- Helbig N, Vogel B, Vogel H e Fiedler F (2004) Numerical modelling of pollen dispersion on a regional scale. *Aerobiologia* **20**: 3–19.
- Helbling A, Brander KA, Horner WE e Lehrer SB (2002) Allergy to Basidiomycetes, em: Breitenbach M, Cramer R, Lehrer SB (eds): Fungal Allergy and Pathogenicity, *Chem Immunol*. Basel, Karger, vol. 81, pp 28-47.
- Henríquez VI, Villegas GR e Nolla JMR (2001) Airborne fungi monitoring in Santiago, Chile. *Aerobiologia* **17**:137–142.
- Ho J, Spence M e Ogston J (2002) Characterizing biological aerosol in a chamber, an approach to estimation of viable organisms in a single biological particle. *Aerobiologia* **17**: 301–312.
- Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE e Lehrer SB (1995) Fungal Allergens. *Clinical Microbiology Reviews*. 8 (**2**): 161-179.
- Iannotti O, Mincigrucci G, Bricchi E e Frenguelli G (2000) Pollen viability as a bio-indicator of air quality. *Aerobiologia* **16**: 361–365.
- Jardim R e Francisco D (2005) *Flores da Ilha da Madeira*. 1ª Ed. Centralivros, Lda.
- Jato V, Dopazo A e Aira MJ (2001) Airborne pollen data of Platanaceae in Santiago de Compostela (Iberian Peninsula). *Aerobiologia* **17**: 143–149.
- Jato V, Méndez J, Rodríguez-Rajo J e Deijo C (2002) The relationship between flowering phenophase and airborne pollen of *Betula* in Galicia (N.W. Spain). *Aerobiologia* **18**: 55-64.
- Jensen PA e Schafer MP (1998) Sampling and Characterization of Bioaerosols. *NIOSH Manual of Analytical Methods*. pp. 82-112.
- Johansson S, Hourihane J, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski M, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M e Wüthrich B (2001) A revised nomenclature for allergy. *Allergy* **56**: 813-824.
- Jones AM e Harrison RM (2004) The Effects of Meteorological Factors on Atmospheric Bioaerosol Concentrations – A Review. *R.M. Sci. Tot. Environ.* **326**: 151-180.
- Jothish PS e Nayar TS (2004) Airborne fungal spores in a sawmill environment in Palakkad District, Kerala, Índia. *Aerobiologia* 20 (**1**): 75-81.

- Kasprzyk I (2003) Flowering phenology and airborne pollen grains of chosen tree taxa in Rzeszów (SE Poland). *Aerobiologia* **19**: 113–120.
- kasprzyk I (2004) Airborne pollen of entomophilous plants and spores of pteridophytes in Rzeszów and its environs (SE Poland). *Aerobiologia* **20**: 217–222.
- kasprzyk I, Harmata K, Myszkowska D, Stach A e Stepalska D (2001) Diurnal variation of chosen airborne pollen at five sites in Poland. *Aerobiologia* **17**: 327–345.
- Kasprzyk IA, Uruska K, Szczepanek M, Lataowa J, Gawe K, Harmata D, Myszkowska A, Stach e Stepalska D (2004) Regional differentiation in the dynamics of the pollen seasons of *Alnus*, *Corylus* and *Fraxinus* in Poland (preliminary results). *Aerobiologia* **20**: 141–151.
- Kellogg CA, Griffin DW, Garrison VHK, Royall KP, Smith RR e Shinn EA (2004) Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa. *Aerobiologia* **20**: 99–110.
- Khandelwal A (2001) Survey of aerospora by Rotorod Sampler in Lucknow, India, qualitative and quantitative assessment. *Aerobiologia* **17**: 77–83.
- Knox B e Suphioglu C (1996) Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends in Plant Science* **1** (5): 156-164.
- Krouse JH, Chadwick SJ, Gordon BR e Derebery MJ (2002) *Allergy and Immunology. An Otolaryngic Approach*, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Lacey J (1995) Sampling and assay of bioaerosols. *Journal of Aerosol Science* **26** (8): 1321-1321.
- Latorre F (1999) Differences between airborne pollen and flowering phenology of urban trees with references to production, dispersal and interannual climate variability. *Aerobiologia* **15**: 131-141.
- Lee KS, Bartlett KH, Brauer M, Stephens GM, Black WA e Teschke K (2004) A field comparison of four samplers for enumerating fungal aerosols I. Sampling characteristics. *Indoor Air* **14** (5): 360-366.
- LETI, S.A., (1998) (Editor) *Livro Branco sobre o Futuro da Imunoalergologia em Portugal, no Horizonte do ano 2005*. Lisboa.
- Leuschner RM, Christen Jordan HP e Vonthein R (2000) 30 years of studies of grass pollen in Basel (Switzerland). *Aerobiologia* **16**: 381–391.
- Levetin E e Horner WE (2002) Fungal Aerobiology: Exposure and Measurement em: Breitenbach M, Cramer R, Lehrer SB (eds) *Fungal Allergy and Pathogenicity*. Chem Immunol. Basel, Karger (2002). vol. 81, pp 10-27.
- Li DW e Kendrick B (1995) A Year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors. *Int. Journal Biometeorol.* **39** (2): 74-80.
- Longo LR, Sauli MP e Ganis P (2004) Aerobiology of *Urticaceae* pollen in Trieste (NE Italy). *Aerobiologia* **20** (1): 53–61.

- Loureiro C (2001) Fungos e alergia respiratória. *Rev. Port. Imunoalergol.* 9 (2): 125-128.
- Lugauskas A, Šveistyte L e Ulevicius V (2003) Concentration and species diversity of airborne fungi near busy streets in Lithuanian urban areas. *Ann Agric Environ Med* 10: 233-239.
- Main C (2003) Aerobiological, ecological, and health linkages. *Environment International* 29: 347-349.
- Márquez J, Seone-Camba JA e Suárez Cervera M (1997) Allergenic and antigenic proteins released in the apertural sporoderm during the activation process in grass pollen grains. *Sex. Pl. Reprod.* 10: 269-278.
- Mattsson JO e Nihlén T (1996) The transport of Saharan dust to southern Europe, a scenario. *Journal of Arid Environment* 32: 111-119.
- Mesa JAS, Smith M, Emberlin J, Allitt U, Caulton E e Galán C (2003) Characteristics of grass pollen seasons in areas of southern Spain and the United Kingdom. *Aerobiologia* 19: 243-250.
- Mesquita S, Capelo J e Sousa J (2004) Bioclimatologia da Ilha da Madeira: abordagem numérica. *Quercetea* 6: 47-59.
- Meyer-Melikian N, Severova E e Polevova S (1996) Pollen grains as a cause of pollinosis. *Journal of Aerosol Science* 27 (Suppl. 1): S251-S252.
- Mezzari A, Perini C, Santos Júnior SA e Bernd JAG (2002) Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trp. S. Paulo* 44 (5): 269-272.
- Minero FJG e Fernández-Mensaque PC (1996) prediction of the benning of the olive full pollen seson in south-west Spain. *Aerobiologia* 12: 91-96.
- Minero FJG, Candau P, Tomás C e Morales J (1998) Airborne grass (*Poaceae*) pollen in southern Spain. Results of a 10-year study (1987-96). *Allergy* 53: 266-274.
- Minero FJG, Fernández-Mensaque PC, Tomás C e Morales J (1997) Patrones de distribución de concentraciones polínicas de varios tipos de polen alergógenos (herbáceas) en relación con factores climatológicos. *Rev Esp. Alergol Immunol Clin.* 12 (6): 357-362.
- Moore PD, Webb JA e Collinson ME (1997) *Pollen Analysis*. 2nd Ed. Blackwell Science.
- Morais de Almeida M e Rosado Pinto J (1999) Bronchial asthma in children: clinical and epidemiologic approach in different Portuguese speaking countries. *Pediatr Pulmonol Suppl.* 18: 49-53.
- Morais de Almeida M, Gaspar A e Rosado Pinto J (2001) Epidemiology of asthma in Portugal, Cape Verde and Macao. *J. Pediatr Pulmonol* 23: 35-37.
- Moreno-Grau S, Angosto JM, Elvira-Rendueles, Bayo J, Moreno J e Moreno-Clave JI (2000) Effects of meteorological parameters and plant distribution on

- Chenopodiaceae-Amaranthaceae, Quercus and Olea* airborne pollen concentrations in the atmosphere of Cartagena (Spain). *Aerobiologia* 16: 17–20.
- Mosteller F e Rourke REK (1993) Dinis Pestana (Editor) *Estatísticas Firmes*. Edições Salamandra, Lda.
 - Muñoz AF, Silva I e Tormo R (2000). The relationships between *Poaceae* pollination levels and cereal yields. *Aerobiologia* 16: 281–286.
 - Neves C (1992) *Laurissilva da Madeira. Caracterização Quantitativa e Qualitativa*. Governo Regional, Secretaria Regional de Agricultura, Florestas e Pescas, Parque Natural da Madeira. pp. 192.
 - Newnham RM (1999) Monitoring biogeographical response to climate change, The potential role of aeropalynology. *Aerobiologia* **15**: 87–94.
 - Nikkels AH, Terstegge P e Spiekama FThM (1996) Ten types of microscopically identifiable airborne fungal spores at Leiden, The Netherlands. *Aerobiologia* **12**: 107-112.
 - Nilsson S (1990) Regional and global distribution of aeroallergens. *Review of Paleobotany and Palynology* **64**: 29-34.
 - Nitíu DS (2004) Intradialurnal fluctuation of pollen in La Plata, Argentina. Part I, herbaceous pollen types. *Aerobiologia* 20: 69-74.
 - Nitíu DS e Mallo AC (2002) Incidence of allergenic pollen of *Acer* spp., *Fraxinus* spp. and *Platanus* spp. in the city of La Plata, Argentina, preliminary results. *Aerobiologia* 18, 65–71.
 - Nitíu DS, Mallo AC e Romero EJ (2003) Quantitative aeropalynology in the atmosphere of Buenos Aires city. Argentina. *Aerobiologia* **19**: 1–10.
 - Nunes C (2003) A epidemiologia das doenças alérgicas. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* **11**: 169-199.
 - Nunes C e Ladeira S (2005) Prevalência de doenças alérgicas em crianças e adolescentes – ISAAC na região do Algarve. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* 13 (1): 47-67.
 - Palma-Carlos AG (1995) Pollinosis in Portugal. *XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology – EAACI'95*. Abstract Book, pp. 685-687.
 - Palma-Carlos AG e Inácio FF (1998) Polinose no Sul da Europa – zona mediterrânea. *Clinical and Experimental Allergy* **1**: 101-102.
 - Pan Y-L, Hartings J, Pinnick RG, Hill SC, Halverson J e Chang RK (2003) Single-Particle Fluorescence Spectrometer for Ambient Aerosols. *Aerosol Science and Technology* **37**: 627-838.
 - Pepeljnjak S e Šegvić M (2003) Occurrence of fungi in air and on plants in vegetation of different climatic regions in Croatia. *Aerobiologia* **19**: 11–19.

- Pestana MM e Gageiro JN (1998) *Análise de dados para Ciências Sociais. A complementaridade do SPSS*. 3ª Edição, Edições Sílabo, pp. 727.
- Peternel R, Culig J e Hrga, I (2004) Atmospheric concentrations of Cladosporium spp. and Alternaria spp. in Zagreb (Croatia) and effects of some meteorological factors. *Ann Agric Environ Med*. 11(2): 303-307.
- Pettyjohn ME e Levetin E (1997) A comparative biochemical study of conifer pollen allergens. *Aerobiologia* **13**, 259-267.
- Picco AM e Rodolfi M (2000) Airborne fungi as biocontaminants at two Milan underground stations. *International Biodeterioration & Biodegradation* **45**: 43-47.
- Platt-Mills TAE e Solomon W (1998) Aerobiology and Inhalant Allergens, p. 367-403 em: [Eds Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW] *Allergy Principles and Practice* vol. II, 5th Ed. Mosby.
- Porsbjerg C, Rasmussen A e Backer V (2003) Airborne pollen in Nuuk, Greenland, and the importance of meteorological parameters. *Aerobiologia* **19**: 29-37.
- Prados-Ligero AM, Melero-Vara JM, Corpas-Hervías C e Basllote-Ureba MJ (2003) Relationships between weather variables, airborne spore concentrations and severity of leaf blight of garlic caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 109 (4): 301-310.
- Prescott LM, Harley JP e Klein DA (1999) *Microbiology* 4th Ed. McGraw-Hill Companies, Inc.
- Press JR e Short MJ (Editors) (1994) *Flora of Madeira*, The Natural History Museum, London.
- Puls KE e Bock KH (1993) Pollen flight forecasting in Germany and in Europe. *Experientia* 49 (11): 943-946.
- Qin Y e Oduyemi K (2003) Atmospheric aerosol source identification and estimates of source contributions to air pollution in Dundee, UK. *Atmospheric Environment* 37 (13): 1799-1809.
- Querol X, Rodríguez S, Cuevas E, Viana MM e Alastuey A (2002) Intrusiones de masas de aire africano sobre la Península Ibérica y Canarias, Mecanismos de transporte y variación estacional. *3ª Asamblea Hispano Portuguesa de Geodesia e Geofísica*. pp. 1-4.
- Quintal R (2003) *Madeira, a Descoberta da Ilha de Campo e a Pé*. 1ª Ed. Associação dos Amigos do Parque Ecológico do Funchal.
- Quintal R e Groz MP (2001) *Parques e Jardins do Funchal*. 1ª Ed. Câmara Municipal do Funchal – Pelouro do Ambiente, Educação e Ciência.
- Ranzi A, Lauriola P, Marletto V e Zinoni F (2003) Forecasting airborne pollen concentrations. Development of local models. *Aerobiologia* **19**: 39-45.

- Recio M, Trigo MM, Toro FJ e Cabezado B (1998) Incidencia del polen de *Chenopodiaceae-Amaranthaceae* en la atmósfera de Málaga y su relación con los parámetros meteorológicos. *Acta Bot. Malacitana* 23: 121-131.
- Reis MA, Oliveira OR, Alves LC, Rita EMC, Rodrigues F, Fialho P, Pio CA, Freitas MC e Soares JC (2002) Comparison of continental Portugal and Azores Islands aerosol during a Sahara dust storm. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. **189**: 272-278.
- Ribeiro H, Cunha M e Abreu I (2003) Airborne pollen concentration in the region of Braga, Portugal, and its relationship with meteorological parameters. *Aerobiologia* **19**: 21-27.
- Rica BV e Torres JS (2001) Polinosis y aerobiología del polen en la atmósfera de Santander. *Allergol Inmunol Clin*. 16: 84-90.
- Ricci S, Bruni M, Meriggi A e Corsico R (1995) Aerobiological monitoring of *Alternaria* fungal spores, a comparison between surveys in 1992 and 1993 and local meteorological conditions. *Aerobiologia* **11**: 195-199.
- Riediker M, Koller T e Monn C (2000) Differences in size selective aerosol sampling for pollen allergen detection using high-volume cascade impactors. *Clinical and Experimental Allergy* **30**: 867-873.
- Rodríguez A, Molina R, Inmaculada P, Corchero A e Muñoz J (2005) Airborne behaviour of *Echium* pollen. *Aerobiologia*. 21 (**2**): 125-130.
- Rodríguez-Rajo FJ, Méndez J e Jato V (2005) Airborne Ericaceae pollen grains in the atmosphere of Vigo (Northwest Spain) and its relationship with meteorological factors. *Journal of Integrative Plant Biology* 47 (**7**): 792-800.
- Roos RA (1996) Bio-aerosols and electric fields, an introduction. *Journal of Aerosol Science* 27 (**1001**): 225-226.
- Rosado Pinto JR e Morais de Almeida M (2003) *A criança asmática no mundo da alergia*. Euromédice, Edições Médicas. Lda. 552 pp.
- Ross A e Fleming D (1994) Incidence of allergic rhinitis in general practice 1981-92. *BMJ* **308**: 897-900.
- Saa Otero MP, Suárez-Cervera M e Gracia VR (1996) *Atlas de Polen de Galicia I*. Deputación de Ourense.
- Sánchez-Mesa JA, Galan C, Martínez-Heras JÁ e Hervás-Martínez C (2002) The use of a neural network to forecast daily grass pollen concentration in a Mediterranean region, the southern part of the Iberian Peninsula. *Clinical & Experimental Allergy* 32 (**11**): 1606-1612.
- Satheesh RP e Rao GR (1994) Fungal spore concentrations in the air at Tiruchirapalli (India) 1987-1988. *Aerobiologia* **10**: 71-75.

- Schlumberger HD (ed) (1987) *Epidemiology of Allergic Diseases*. vol. 21. Karger. Switzerland.
- Sen B e Asan A (2001) Airborne fungi in vegetable growing areas of Edirne, Turkey. *Aerobiologia* **17**: 69–75.
- Shäppi GH, Taylor PE, Staff IA, Roland JM e Suphioglu C (1999) Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy* **55**: 478-483.
- Smith EG (1986a) *Sampling and identifying allergenic pollen and molds*. Vol. I. Blewstone Press San Antonio, Texas.
- Smith EG (1986b) *Sampling and identifying allergenic pollen and molds*. Vol. II. Blewstone Press San Antonio, Texas.
- Spieksma F (1990) Pollinosis in Europe, New Observations and Developments. *Revista Paleobot. Palynolo.* **64**: 35-40.
- Stegmann P (2004) Remote monitoring of aerosols with ocean colour sensors, then and now. *International Journal of Remote Sensing* 25 (**7-8**): 1409-1413.
- Stepalska D, Harmata K, Kasprzyk I, Myszkowska D e Stach A (1999) Occurrence of airborne *Cladosporium* and *Alternaria* spores in Southern and Central Poland in 1995–1996. *Aerobiologia* **15**: 39–47.
- Sterling M, Rogers C e Levetin E (1999) An evaluation of two methods used for microscopic analysis of airborne fungal spore concentrations from the Burkard Spore Trap. *Aerobiologia* **15**: 9–18.
- Subiza J (2001) Cómo interpretar los recuentos de pólenes. *Alergol Inmunol Clin* **16**: 59-65.
- Subiza J (2003) Gramíneas: Aerobiología y polinosis en España. *Alergol Inmunol Clin* 18 (**3**): 7-23.
- Syrigou E, Zanikou S e Papageorgiou PS (2003) Grasses, olive, parietaria and cypress in Athens, Pollen sampling from 1995 to 1999. *Aerobiologia* **19**: 133–137.
- Tariq SM, Matthews SM, Stevens M e Hakim EA (1996) Sensitization to *Alternaria* and *Cladosporium* by the age of 4 years. *Clinical and Experimental Allergy* **26**: 794-798.
- Teptin GM e Douriaguine PN (1996) On simulation of biological aerosol particles distribution in turbulent atmosphere and its applications. *Journal of Aerosol Science* 27 (**1001**): 245-246.
- Tomaz IL (2001) *Doenças das Plantas*. Publicações Europa-América, Lda.
- Toro FJ, Recio M, Trigo MM e Cabezudo B (1998) Predictive models in aerobiology, data transformation. *Aerobiologia* **14**: 179-184.
- Torres JM (2002) Hongos y alergia o un binomio polémico. *Alergia e Inmunología Clínica* **17**: 139-140.
- Trabelulsi A (1991) *Microbiologia*. 2ª Edição Atheneu. São Paulo.

- Tribaudon M e Lachasse C (2005) Phénologie: intérêt et methods en aérobiologie. *Revue Française D'Allergologie et D'Immunologie Clinique* **45**: 94-199.
- Trigo MM, Cabezudo B, Recio M e Toro FJ (1996) Annual, daily and diurnal variations of Urticaceae airborne pollen in Málaga (Spain). *Aerobiologia* **12**: 85-90.
- USGS Open-File Report 03-028 (2003) African dust carries microbes across the ocean, are they affecting human and ecosystem health? U.S. Department of the Interior and U.S. Geological Survey.
- Viana M, Querol X, Alastuey A, Cuevas E e Rodriguez S (2002) Influence of African dust on the levels of atmospheric particulates in the Canary Islands air quality network. *Atmospheric Environment* 36 (**38**): 5861-5875.
- Villalta ON, Whashington WS, Rimmington G e MacHardy W (2001) Environmental factors influencing maturation and release os ascospores of *Venturia pirina*. *Australian Journal of Agricultural Research* 52 (**8**): 825-837.
- Waisel Yo, Mienis Z, Kosman E e Geller-Bernstein C (2004) The partial contribution of specific airborne pollen to pollen induced allergy. *Aerobiologia* 20: 197-208.
- Watling R (2003) *Fungi*. The Natural History Museum, London.
- Weir-Brush JR, Garrison VH, Smith GW e Shinn EA (2004) The relationship between gorgonian coral (Cnidaria, Gorgonacea) diseases and African dust storms. *Aerobiologia* **20**: 119-126.
- Wittmaack K, Wehnes H, Heinzmann U e Agerer R (2004) An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy. *Science of the Total Environment* **364**: 244-255.
- Xue J, Yongqi W, Binyong W, Jincai X, High Spectral Resolution Airborne Optical Sensor, The 20th Asian Conference on Remote Sensing, November 22-25, 1999, Hong Kong (China), (<http://www.gisdevelopment.net/aars/acrs/1999>).
- Zanotti A Z e Puppi G (2000) Phenological surveys of allergenic species in the neighbourhood of Bologna (Italy). *Aerobiologia* **16**: 199-206.

**CAPÍTULO II - DETECÇÃO BIOQUÍMICA DOS PRINCIPAIS AEROALERGÉNIOS
POLÍNICOS DA CIDADE DO FUNCHAL**

INTRODUÇÃO

1. Aeroalergénios. Definição e Propriedades

Os aerolergénios são moléculas antigénicas que após o contacto com as vias respiratórias, a pele ou as membranas mucosas de indivíduos sensibilizados, são capazes de desencadear reacções imunológicas associadas à IgE. Tal como a maioria dos alergénios, são proteínas ou glicoproteínas de elevada solubilidade e baixa massa molecular (5-100 kDa) (López, 1999).

Os ácaros do pó, o pêlo dos animais domésticos e o pólen, pertencem ao grupo dos aeroalergénios mais comuns sendo considerados os principais agentes alergizantes na sensibilização de indivíduos atópicos. No entanto, para além destes, os alergénios alimentares e os esporos de fungos desempenham também um papel preponderante no desenvolvimento da alergia (López, 1999; Johansson et al, 2001; Arshad, 2002).

O pólen constitui uma das mais importantes fontes de alergénios presente no meio ambiente, e 10 a 25% da população dos países temperados apresenta sintomas de asma e rinite alérgica provocada pelos seus alergénios (Behrendt e Becker, 2001).

1.1. Síntese e Localização Ultraestrutural dos Alergénios

Normalmente sintetizados no citoplasma, difundem para o exterior através da parede quando o pólen é humedecido. A localização de um alergénio dentro da sua fonte biológica e a forma como se produz a sua libertação é importante não só para investigar a sua função biológica como também pode ajudar a elucidar como uma proteína alergénica é processada pela superfície da mucosa e como o sistema imunitário responde a ela (Behrendt et al, 1999; Park et al, 2000). Um dos métodos principais para determinar a localização ultraestrutural de proteínas consiste no uso de técnicas de imunolocalização (Fig. II 1).

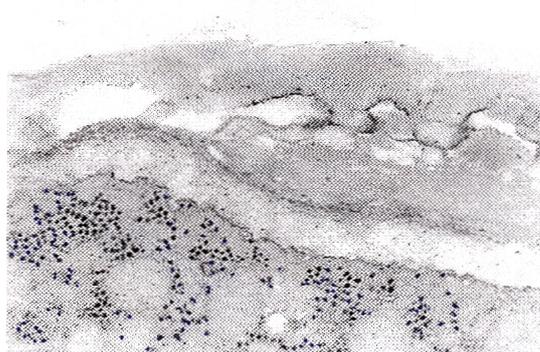


Fig. II 1. Ilustração da localização ultraestrutural de proteínas nos grãos de pólen. Observa-se reacção antigénio-anticorpo na intina e no citoplasma do pólen de *Prunus* (Arcalis et al, 1998).

A localização de um alergénio de distintas espécies no mesmo órgão permite colocar a hipótese de uma homologia quanto à função biológica e estrutural (Freile, 2001).

1.2. Nomenclatura e Classificação

O sistema de nomenclatura dos alergénios foi estabelecido pela IUIS (União Internacional das Sociedades de Imunologia) em 1978, baseando-se no nome taxonómico do género. Em geral, o nome do alergénio dispõe da seguinte ordem: as três primeiras letras indicam o género, espaço, a primeira letra da espécie, espaço, e um número arábico que indicará a ordem cronológica da purificação (King et al, 1995). Por exemplo, Par j 1, corresponde ao primeiro alergénio purificado de *Parietaria judaica*.

Os alergénios podem classificar-se como maioritários ou “*major*”, aqueles que são reconhecidos por pelo menos 50% dos pacientes alérgicos àquela fonte alergénica e minoritários ou “*minor*”, se reconhecidos somente por menos de 10% dos pacientes (Knox e Suphioglu, 1996; Knox et al, 1997; López, 1999; Behrendt e Becker, 2001; Arshad, 2002). Na realidade, a relevância dos alergénios depende da proporção de pacientes que desenvolvem IgE contra eles (Freile, 2001).

1.3. Transporte dos Alergénios do Pólen

Os alergénios do pólen são transportados principalmente nos grãos de pólen. O tamanho dos grãos de pólen não lhe permite aceder às regiões bronquiais, pois atingem os 20 µm de diâmetro (Behrendt e Becker, 2001). Os alergénios do pólen são solúveis em água, sendo rapidamente libertados em locais húmidos como as mucosas, podendo, por isso, provocar reacções alérgicas em segundos. Para explicar os sintomas associados a estas regiões muitos autores propuseram a existência dum segundo transporte de alergénios adsorvidos às partículas de tamanho inferior (0,1 µm) capazes de penetrar nas zonas profundas do tracto respiratório (Solomon et al, 1983; Schumacher et al, 1988; Spieksma et al, 1990; Rantio-Lehtimäki et al, 1994). Foi documentada a presença de alergénios de gramíneas em partículas atmosféricas mais pequenas que grãos de pólen nos dias em que as concentrações de pólen de gramíneas eram baixas. Constatou-se que o pólen de gramíneas rompe por choque osmótico quando há precipitação. Cada grão liberta cerca de 700 moléculas alergénicas, juntamente com grânulos de amido (em Schäppi et al 1999), com dimensão a variar entre 0,6-2,5 µm, incluindo os alergénios maioritários, capazes de desencadear reacções IgE mediadas em indivíduos sensibilizados ao pólen de gramíneas (Schäppi, 1998).

A origem destas partículas não está clara, sugerindo-se quatro possibilidades: fragmentos de grãos de pólen (Solomon, 1986), grãos de amido (Suphioglu et al, 1992) outras partes da planta (Agarwal et al, 1984), e partículas ambientais não procedentes das plantas que incorporam os alergénios por contacto (Behrendt et al, 1992). Os orbículos, por exemplo, se presentes em espécies alergénicas, podem aerosolizar, provindo das anteras aquando da antese. Se os alergénios estão presentes nessas estruturas e são libertados para a atmosfera, poderão actuar como vectores de alergénios (Vinckier e Smets, 2001).

1.4. Função Biológica dos Alergénios

Os alergénios não parecem ter uma função biológica que explique a sua alergenicidade para além da implicada no fenómeno da hidratação e/ou crescimento do tubo polínico. Em alguns casos, demonstrou-se que a sua função bioquímica pode promover certas condições imunológicas que favorecem a sensibilização (Freile, 2001). O isolamento e a caracterização dos diferentes alergénios tem permitido definir as suas características físico-químicas e agrupá-los consoante a sua função biológica e homologia. Os exemplos mais conhecidos são relativos a alérgenos com actividade proteásica e proteolítica, e aos identificados como profilinas e enolases, induzindo em última análise, a síntese de IgE (WHO/IUS, 1995; Freile, 2001).

1.5. O Reconhecimento Antígeno-IgE

O sistema imunitário reconhece os alergénios através de pequenas secções da molécula, denominadas determinantes ou epítomos, capazes de unirem-se à IgE específica e desencadear uma resposta alérgica IgE mediada (Fig. II 2).

As células do sistema imunitário (linfócitos B, linfócitos T e células fagocitárias) envolvidas no reconhecimento com o alergénio, através das moléculas de IgE e do complexo "major" de histocompatibilidade, reagem a dois tipos de determinantes: os conformacionais, formados por secções descontínuas da estrutura primária da proteína, devido à constituição tridimensional da molécula; e os lineares, formados por uma sequência da estrutura primária da proteína (Baldo, 1983; Galli e Lantz, 1999; López, 1999; Behrendt e Becker, 2001).

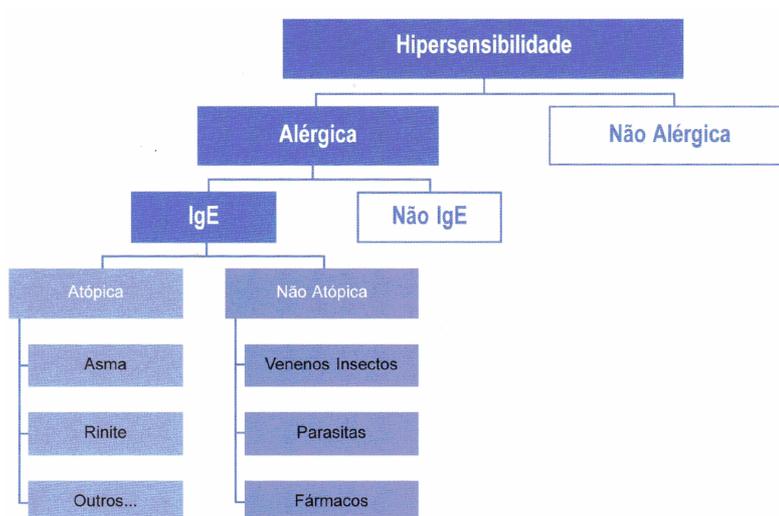


Fig. II 2. Reacções de hipersensibilidade mediada pela IgE (Adaptado do Manual de Imunoalergologia 2004/2005, PHARMACIADiagnostics).

1.5.1. IgE e Doença Alérgica

A IgE é a principal imunoglobulina envolvida nas reacções alérgicas. Este anticorpo pode encontrar-se livre no soro ou ligado às células do sistema imunitário (mastócitos e basófilos). Em indivíduos não atópicos, os níveis séricos de IgE são muito baixos representando menos de 0,01% do total das imunoglobulinas, podendo corresponder em condições normais de concentração sérica, à Classe "0" de IgE (Fig. II 3) (Centner e Weck, 1995; Arshad, 2002). A concentração de IgE em indivíduos atópicos pode ser 100 a 1000 vezes superior à dos indivíduos adultos normais, apresentando menos de 100 ng/ml.

Os anticorpos IgE são produzidos como consequência da exposição a alérgenos do ambiente. Diferenças regionais resultam em diferentes padrões de especificidade de IgE (Ahlstedt, 2002).

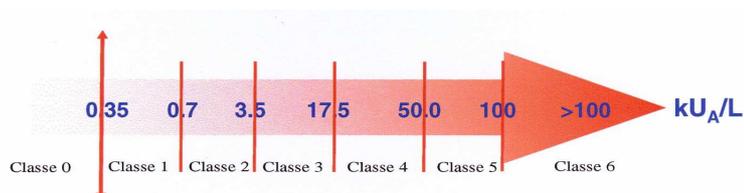


Fig. II 3. Classes de IgE. Adaptado de Nunes (2005), Rastreamento da Doença Alérgica - O Estudo Alérgico.

1.6. Factores de Desenvolvimento dos Processos Alérgicos

Os processos alérgicos tem uma origem multifactorial. Muitos têm sido os factores descritos que, de algum modo, estão relacionados com o mecanismo da alergia. Neste sentido serão citados alguns cuja influência esteja constatada. Globalmente, estes factores podem dividir-se em factores ambientais e genéticos (Lund et al, 2005) (Fig. II 4).



Fig. II 4. Factores desencadeantes no desenvolvimento da doença alérgica. Adaptado de Nunes (2005), Rastreio da Doença Alérgica - O Estudo Alergológico.

1.6.1. Factores Ambientais

Visto que a alergia é uma doença com maior prevalência e severidade nos países ocidentais e industrializados, numerosos autores tentaram explicar este fenómeno analisando factores próprios destes países, como os hábitos alimentares, a poluição e a exposição a doenças microbianas (Mutius, 2000; Cariñanos et al, 2001). Os indivíduos residentes no meio urbano têm mais probabilidade de exibir sintomas de alergia respiratória, particularmente aquelas induzidas por alergénios do pólen (D'Amato et al, 2000; Fernvik et al, 2002). Além disso, os grãos de pólen dispersos na atmosfera podem interagir com aerossóis, tais como partículas poluentes (D'Amato e Liccardi, 2002; Holmquist et al, 2001), nomeadamente compostos como o NO_2 , O_3 , etc., favorecendo o aparecimento de episódios de asma, particularmente após condições meteorológicas de humidade, precipitação e de trovoadas (Salvi, 2001; Desqueyroux et al, 2002). Contudo, estas associações permanecem controversas (Ramadour et al, 2000; Taylor et al, 2002).

Nenhum dos factores ambientais foi demonstrado como determinante no desenvolvimento da alergia. Possivelmente, outros factores como a idade, o sexo ou o habitat também podem influir. Para além do componente genético, o factor principal desencadenante da alergia residirá na dose e no tempo de exposição ao alergénio (Granum et al, 2001), pelo

que a medida preventiva primordial deve ser evitar o contacto com o mesmo (Neijens e Dreborg, 1995; Fasce et al, 2004).

1.6.2. Factores Genéticos

Estudos recentes levados a cabo em famílias atópicas evidenciaram que, tanto a condição atópica como as desordens específicas da alergia têm um forte componente genético e que indivíduos que possuem um “fenótipo atópico” são muito mais susceptíveis de sofrer esta doença. Pese o *claro* papel dos factores genéticos, não foi ainda possível estabelecer um padrão de herança mendeliana que se ajuste à realidade. Na actualidade, a investigação neste campo está dirigida à identificação de genes que permitam um melhor conhecimento da fisiopatologia do processo alérgico (Freile, 2001).

1.7. Aeroalergénios Importantes

As gramíneas são a principal causa de polinose em diversas regiões do mundo, pois representam 20% da vegetação do planeta, e constituem o elemento dominante de polinização anemófila (Nilsson, 1990; Wissenbach et al, 1998; Miltgen et al, 2001; Arilla et al, 2002). Foram descritos 11 grupos de alergénios no pólen de gramíneas, 8 dos quais são considerados alergénios principais, sendo os grupos 1, 4 e 5 considerados dominantes em virtude da sua elevada reactividade com a IgE (Fahlbusch et al, 1998; Arilla et al, 2002).

Em Portugal, a polinose é a segunda maior causa de alergia respiratória, logo depois da alergia aos ácaros do pó. A sensibilização a gramíneas ronda os 80 – 90% dos pacientes, seguida da *Parietaria* com cerca de 30%, e da Oliveira com 17% dos casos de polinose (Palma-Carlos, 1995).

Lolium perenne, *Dactylis glomerata*, *Phalaris aquatica*, *Poa pratensis*, *Triticum aestivum* e *Cynodon dactylon* são consideradas as 6 espécies alergenicamente mais importantes entre as gramíneas. Um estudo realizado com estas plantas permitiu concluir que os alergénios maioritários de *L. perenne*, *P. aquatica*, *P. pratensis* e *C. dactylon* possuem uma massa molecular entre 30 – 36 kDa, e os de *D. glomerata* e *T. aestivum*, entre os 25 – 30 kDa (Baldo e Bass, 1990).

Os pólenes das urticáceas, onde *Parietaria judaica* e *P. officinalis* são os principais responsáveis pelo aparecimento de alergias nalgumas regiões do Mediterrâneo, deve-se à ampla distribuição dessas espécies nessas regiões. No entanto, a reactividade aos alergénios destas plantas foi também descrita no sul do Reino Unido, na Áustria, nas regiões temperadas da Europa central e de leste, na Austrália e na Califórnia. O alergénio

maioritário de *P. officinalis*, Par o 1, é uma glicoproteína com um ponto isoeléctrico de 4,6 e uma massa molecular de 10 – 15 kDa. De *P. judaica* foram isoladas duas isoformas com massas moleculares de 13 e 10,5 kDa (Nilsson, 1990; Trigo et al, 1996; Colombo et al, 1998; López, 1999; Miltgen et al, 2001).

2. Caracterização de Alergénios

A caracterização de alergénios consiste na obtenção de um extracto da fonte alergénica, na análise da composição do extracto, detecção de proteínas alergizantes e na purificação do alergénio. O alergénio ou molécula alergénica, representa a entidade individual de um extracto alergénico complexo.

O progresso na caracterização de proteínas alergénicas permitiu identificar a função biológica de muitos alergénios clinicamente relevantes. Até ao momento, as funções bioquímicas correspondentes a estas proteínas são: enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas de transporte, de defesa ou proteínas reguladoras.

2.1. Etapas da Caracterização de Alergénios

A primeira etapa da caracterização de alergénios envolve a preparação de um extracto do material biológico responsável pelo aparecimento da alergia, neste caso, do pólen. As soluções usadas na extracção de proteínas do pólen são geralmente soluções salinas, como tampão fosfato salino (PBS), tampões borato, bicarbonato de amónia e cloreto de sódio (Carnés et al, 2002). Vários trabalhos reportam o bicarbonato de amónia como o solvente mais utilizado. O tempo de extracção varia de algumas horas até 24 h em agitação magnética (Carnés et al, 2002). A libertação dos alergénios está dependente da temperatura e do pH (Behrendt e Becker, 2001). Normalmente, o processo de extracção decorre a 4°C e a pH ligeiramente básico, à volta de 8. Neste trabalho foi utilizado o tampão fosfato a pH 7 dado ter-se revelado o mais adequado para a extracção proteica. Quando o grão de pólen contacta com a mucosa do tracto respiratório, os alergénios libertam-se rapidamente e em grandes quantidades. Em estudos realizados acerca da solubilidade dos alergénios, verifica-se a eluição de grande quantidade de proteína nos primeiros minutos de extracção. Contudo, o máximo de proteína obtém-se somente ao fim de algumas horas de extracção (Pettyjohn e Levetin, 1997; Carnés et al, 2002).

2.2. Dificuldades na Análise de Alergénios

Uma complicação frequente nos alergénios estudados é que muitos deles são moléculas polimórficas, isto é, não estão constituídos por uma única sequência de aminoácidos, consistindo num número de sequências originadas por substituições de aminoácidos numa ou várias posições e que dão lugar a variações nas suas propriedades físicoquímicas (massa molecular e ponto isoeléctrico). Estas sequências distintas são designadas de isoformas ou variantes e as suas similitudes são expressas em termos de homologia de sequência (Thomas et al, 1998).

Por outro lado, as diferenças na massa molecular e na carga podem ser originadas pelas modificações pós-traduccionais das proteínas, como por exemplo, a glicosilação. Assim, muitos dos alergénios descritos estão glicosilados, e as suas distintas formas isoalergénicas resultam de pequenas variações na porção carbohidratada (Smith et al, 1994, Matthiesen e Schumacher, 1991).

2.3. Técnica Electroforética para a Caracterização Bioquímica de Alergénios

A electroforese é um método de caracterização das proteínas. Na caracterização dos alergénios a electroforese é usada tanto na separação das proteínas que constituem um extracto, como na avaliação do grau de pureza de um alergénio após a sua purificação. No estudo dos alergénios é mais frequente a electroforese desnaturante (SDS-PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), detergente aniónico que forma um complexo com a proteína, previamente desnaturada por acção do calor, na presença de 2-mercaptoetanol. Dado que todas as proteínas ligadas ao SDS têm a mesma carga, a mobilidade dos complexos dependente somente da massa molecular da cadeia polipeptídica. A PAGE nativa ou não desnaturante, tem como objectivo fraccionar uma mistura de proteínas, de modo que a conformação nativa e a actividade biológica da proteína sejam conservadas. Neste tipo de separação, o tamanho, assim como a carga, influenciam a mobilidade electroforética da molécula (Hames, 1981; Alface, 1997; Díez de Celis, 1998; Simões de Carvalho, 2003).

2.4. Immunoblotting

Quando é utilizado gel de poliacrilamida na separação electroforética, a detecção dos péptidos com actividade alérgica realiza-se por *immunoblotting*. A detecção dos alergénios faz-se através de incubação de membranas com anticorpos específicos marcados radioactivamente ou com uma enzima. Deste modo, é possível identificar as proteínas com

características alergizantes através da visualização de um precipitado colorido (quando é usada uma enzima como marcador) no local da banda que corresponde à proteína responsável pela acção alergénica (Fig. II 5) (Azinheira e Castro, 1998; Díez de Celis, 1998). Com a transferência dos péptidos para a nitrocelulose, obtém-se uma réplica exacta do gel de poliacrilamida que permite a aplicação imediata de anticorpos específicos e conseqüentemente, a detecção de proteínas com actividade alergénica (Baldo, 1983; Tovey et al, 1987).

A reacção que ocorre entre o alergénio ligado à nitrocelulose e o anticorpo presente no soro de um paciente, por si só, não é detectável. Para contornar este problema utilizam-se sistemas de amplificação da reacção imunológica. Neste trabalho foi utilizado o sistema de amplificação biotina/estreptavidina. Na figura II 5, está representada de forma esquemática, a amplificação da reacção. A estreptavidina funciona como ponte de ligação entre a fosfatase alcalina e o anticorpo de revelação.

As moléculas de biotina acopladas à enzima e ao anticorpo permitem o estabelecimento da ligação à estreptavidina. Após a adição do substrato visualiza-se um precipitado púrpura no local onde se deu a reacção alergénio/anticorpo (Coll, 1998).

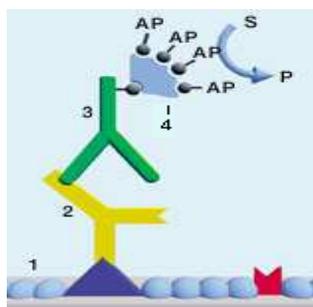


Fig. II 5. Esquema representativo da amplificação da reacção imunológica. **1**, membrana de nitrocelulose com os alergénios ligados; **2**, anticorpo específico para o alergénio (IgE); **3**, anticorpo de revelação com uma molécula de biotina acoplada; **4**, complexo estreptavidina/fosfatase alcalina biotinada (AP, fosfatase alcalina); **S**, substrato (NBT/BCIP); **P**, precipitado púrpura (adaptado de Bio-Rad Bulletin 1600 EG).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material Vegetal

Na realização deste trabalho foi utilizado o pólen de 10 espécies de plantas provenientes do Funchal, com excepção das Asteráceas que foram colhidas no Porto Moniz e Encumeada: *Artemisia argentea* (Asteraceae), *Carduus squarrosus* (Asteraceae), *Carlina salicifolia* var. *salicifolia* (Asteraceae), *Echium nervosum* (Boraginaceae), *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *Acacia mearnsii* (Fabaceae), *Pinus pinaster* (Pinaceae), *Avena barbata* (Poaceae), *Datura candida* (Solanaceae) e *Urtica membranosa* (Urticaceae).

Do estudo aerobiológico da cidade do Funchal realizada no período 2002-2004, foi possível identificar as famílias mais frequentes no ar e seleccionar as espécies para posterior análise bioquímica.

Optámos por identificar as 8 famílias de pólen mais frequentes, a fim de seleccionar uma espécie que apresentasse uma distribuição frequente na cidade do Funchal. No caso das Asteraceae, foram incluídos os géneros *Carduus* e *Carlina* devido ao facto de fazerem parte de uma linha de investigação anterior, relativa à caracterização proteica do pólen de Asteraceae da Madeira.

Pela análise bioquímica pretende-se estudar a fracção proteica destes extractos, cuja composição não está todavia documentada na literatura, determinando as proteínas com actividade serológica.

2. Tratamento do Material

As flores foram colhidas durante a floração. O material foi colocado em estufa a 37°C, durante 24 horas e procedeu-se ao isolamento das anteras maduras e do pólen das partes florais para a extracção das proteínas. Em relação a *E. nervosum* e *D. candida*, com o auxílio de uma lupa Leica Wild M3, seleccionaram-se as anteras onde havia pólen. Do mesmo modo, se separaram os sacos polínicos de *P. pinaster*. Nas restantes plantas, devido ao reduzido tamanho das peças florais, isolou-se a flor na totalidade. Em seguida, separam-se manualmente as partes florais utilizando uma rede de malha com 125 µm diâmetro de forma a reter o material e transferir as anteras e os grãos de pólen para uma caixa de Petri. Confirmou-se o grau de pureza do material separado por observação ao microscópio óptico. As amostras foram conservadas à temperatura de -85°C, para posterior análise.

3. Soros

Os soros de pacientes alérgicos utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Regional de Saúde Pública Dr. Câmara Pestana. Foram utilizados oito soros de indivíduos aos quais foi diagnosticada alergia respiratória (4 pertenciam a indivíduos do sexo feminino e 4 a indivíduos do sexo masculino). Todos os pacientes apresentavam sintomatologia alérgica sazonal, associada a episódios de asma, rinite e angiodema, nomeadamente na Primavera e Verão. A selecção foi realizada com base nos níveis desta elevados de IgE total e de RAST (Classes 5 e 6), e na idade (≥ 9 anos). A partir desta idade a alergia do tipo inalante assume um papel preponderante (Madsen, 1997). Como controle negativo incluiu-se o soro de um indivíduo com reacção cutânea negativa a extractos de pólen e com uma IgE total muito baixa.

Cinco dos indivíduos realizaram o teste de rastreio Phadiatop, e um o teste múltiplo gx1, ambos pela técnica de RAST. Em quatro destes casos foi ao mesmo tempo verificada hipersensibilidade aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae* (tabela A 2, anexo). Dois soros pertenciam a indivíduos com alergia alimentar e respiratória, e haviam realizado o teste múltiplo Fx5E.

4. Extracção das Proteínas do Pólen

Os extractos de proteínas do pólen foram preparados seguindo o procedimento de extracção de alergénios adoptado pelos laboratórios Alk-Abelló, S.A - Madrid.

Pesou-se para um gobelé, 0,900 g de material vegetal de *P. pinaster*, e 0,200 g para as restantes espécies.

A extracção iniciou-se com a homogenização do pólen numa solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7, numa proporção de 1:10 (p/v), em agitação magnética, durante 90 min e à temperatura de 4°C. O pólen de *P. pinaster* esteve em agitação durante 180 min. Transferiu-se a suspensão para um tubo, o qual foi a centrifugar a 12000 g, durante 30 min a 4°C (Jouan KR 22i). O sobrenadante foi recolhido com uma pipeta de Pasteur para tubos de ensaio e o sedimento foi eliminado. O sobrenadante foi filtrado em filtros Millipore de tamanho de poro 0,45 μm e armazenado em eppendorfs a -18°C.

4.1. Diálise

Procedeu-se à diálise do extracto, antes da filtragem com filtros Millipore, dado verificar-se uma melhor definição dos perfis electroforéticos. A diálise do extracto proteico realizou-se contra o tampão de extracção usando uma membrana de poro 12 a 14 KDa (Medicell

International), durante 24 h a 4°C. O dialisado foi centrifugado a 12000 g, durante 30 min à temperatura de 4°C (Jouan KR 22I).

5. Quantificação de Proteína

A quantificação da proteína total realizou-se segundo o método de Lowry (Lowry et al, 1951). Foi elaborada uma recta de calibração com uma solução de albumina sérica de bovino (BSA) de 1,5 mg/ml, que permitiu a determinação do conteúdo de proteína nas amostras. Na construção da recta utilizaram-se os valores médios das absorvâncias de 6 duplicados por concentração de proteína.

6. Caracterização Molecular

Para determinar o tamanho molecular das proteínas, assim como para comprovar o seu grau de pureza, utilizou-se a técnica SDS-PAGE. Neste trabalho foram utilizados géis de glicina preparados no laboratório. Todas as electroforeses realizaram-se em condições redutoras. Nestas condições adicionou-se à amostra 2-mercaptoetanol a uma concentração final de 5% (Hames, 1981).

7. Preparação de Extractos

Os extractos foram diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7 (tampão de extracção), na proporção de 1:1 (v/v). Após esta diluição, pipetou-se para um eppendorf 40 µl de extracto diluído e 20 µl de tampão de tratamento (12,5% Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8; 10% de glicerol a 10%; 20% de SDS a 10%; 5% de 2-mercaptoetanol e 2,5% de azul de bromofenol a 5%) Agitou-se a mistura no vórtex e incubou-se num banho termostaticado à temperatura de 100°C, durante 5 min.

Padrões de massa molecular foram usados os marcadores do Kit Low Molecular Weight (Amersham Pharmacia Biotech): fosforilase B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbónica (31,0 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Adicionou-se 1 µl do Kit a 49 µl de tampão de tratamento, e incubou-se a mistura da mesma forma que as amostras, mas somente durante 3 min.

8. SDS-PAGE

A electroforese decorreu segundo o protocolo de Laemmli (1970), num sistema tampão de pH descontínuo. A preparação do gel foi feita de acordo com Blattler et al (1972), e tinha uma dimensão de 7,3 cm de altura por 8 cm de comprimento e 0,75 mm de espessura.

Com a ajuda de micropipeta aplicaram-se 15 µl de marcador num poço e 15 µl de extracto incubado nos restantes poços. Para uma melhor visualização da separação electroforética, adicionou-se 10 gotas de azul de bromofenol a 1%, no reservatório do tampão do eléctrodo catódico. A composição do tampão dos eléctrodos catódico e anódico é dada em anexo.

A separação electroforética decorreu no sistema Mini-Protean 3 Cell da Bio-Rad a uma voltagem constante de 200 V, durante 1h e 10 min. Durante a separação, o aparelho foi mantido numa tina com gelo até à superfície. Todos os géis foram preparados pelo menos por duas vezes e o erro experimental para cada proteína ou péptido foi inferior a 10%.

9. Revelação das Proteínas

A revelação do gel e a detecção das proteínas foi realizada com nitrato de prata, segundo Blum et al (1987) (Tabela A 1, Anexos), em agitação constante e à temperatura ambiente. A secagem dos géis decorreu no Gel Air Dryer da Bio-Rad, durante 1 h.

10. Determinação da Massa Molecular em SDS-PAGE

Mediante a electroforese foi possível determinar a massa molecular de cada banda diferenciada por densitometria, através do programa informático *Photo Capt Mw* (Amerhasm).

11. Immunoblotting. Transferência das Proteínas para a Membrana de Nitrocelulose

A transferência decorreu num sistema semi-seco, Trans-blot SD da Bio-Rad, a aproximadamente 300 mA (cerca de 14-15 V), durante 1h.

O gel de separação usado na transferência das proteínas tinha uma concentração de 15% de acrilamida (composição em anexo). O tampão de tratamento usado para a incubação das amostras para o *immunoblotting* tinha uma composição ligeiramente diferente do tampão usado para a técnica electroforética, isto é, na solução de incubação preparada para o *immunoblotting* substituiu-se o 2-mercaptoetanol por tioglicol. Para a transferência, o extracto proteico não foi diluído com tampão fosfato antes de preparação da amostra.

A membrana de nitrocelulose tinha um poro de 0,20 μm . A transferência foi feita em duplicado, sendo uma folha de membrana de 7x10 cm usada na revelação das proteínas transferidas, e 9 tiras com 0,4x5,5 cm na detecção de alergénios através da incubação com o soro sanguíneo. A nitrocelulose foi previamente humedecida em água destilada e mergulhada em tampão de transferência (composição em anexo) durante 10 min. Também se embebeu o gel de poliacrilamida em tampão, durante 30 min. Montou-se a *sandwich*, colocando sobre o ânodo (base do aparelho) uma folha de papel de filtro seguida da membrana de nitrocelulose, do gel e de outra folha de papel de filtro, previamente humedecida em tampão de transferência, tal como a primeira.

Todos os extractos proteicos foram utilizados no *imunoblotting* à excepção de *Avena barbata*. O processo de obtenção do seu polimorfismo proteico foi mais demorado relativamente aos outros extractos e a quantidade de soro disponível condicionou a realização do ensaio.

Previamente ao *imunoblotting* foram obtidos 2 géis. Para um deles as amostras de extracto foram tratadas com 2-mercaptoetanol, para o outro, incubaram-se as amostras com um tampão com tioglicol em substituição daquele agente redutor. Mesmo não se observando quaisquer diferenças entre os dois géis, em nenhuma das espécies, para o *imunoblotting*, as amostras foram tratadas com tioglicol. Deste modo, certificamo-nos de que a integridade das biomoléculas dos extractos não fora afectada.

12. Detecção da Reacção Antigénio-Anticorpo

Na detecção foi usado o sistema de amplificação biotina/estreptavidina da Bio-Rad (EUA). Este *kit* permite detectar até 10 picogramas de proteína ligada à nitrocelulose. Terminada a transferência, as tiras de membrana foram imersas numa solução de saturação (composição em anexo), durante 1h. Após a lavagem com solução de lavagem (TTBS) (composição em anexo), deixou-se as tiras a incubar, durante a noite em soro humano diluído em TTBS, na proporção de 1:15. Lavou-se novamente as tiras com TTBS, três vezes durante 4 min cada lavagem. Adicionou-se o segundo anticorpo, específico para a IgE humana (*Biotinylated anti-human goat IgE antibodies*) e deixou-se decorrer a reacção, durante 1h e 30 min. Entretanto, procedeu-se à preparação do complexo estreptavidina/fosfatase alcalina biotinada. As tiras de nitrocelulose, foram incubadas com o complexo durante 1h e 30 min. Após o que se realizou as lavagens finais com TTBS para remover o excesso de reagente. Todos os passos da detecção decorreram sob leve agitação e à temperatura ambiente. A cada tira de membrana foi adicionado 1 ml de solução da respectiva etapa, sendo esse volume retirado após o tempo de reacção.

Para obter a coloração, incubou-se a membrana com solução de desenvolvimento da cor (composição em anexo), a mistura foi levemente agitada, à temperatura ambiente, até aparecerem bandas de tonalidade rosa. Havendo reacção, as bandas ficam visíveis ao fim de 30 min. Após o aparecimento da cor, parou-se a reacção retirando a solução anterior e lavando com água destilada duas vezes, durante 5 min cada. Finalmente deixaram-se secar as tiras à temperatura ambiente. Repetiu-se este procedimento para os 8 soros testados e para o controlo.

13. Revelação das Proteínas Transferidas para a Membrana

O método usado na detecção das proteínas foi o do nitrato de prata. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi colocada numa tina de vidro e lavada 3 vezes com água destilada, durante 5 min cada. Entretanto, preparou-se uma solução com 5 ml de citrato de sódio a 40%, 4 ml de sulfato de ferro a 20% e 90 ml de água destilada. Depois de homogeneizada, adicionou-se lentamente 1 ml de solução de nitrato de prata a 20% e deixou-se repousar 1 a 2 min até se formar uma suspensão que é usada (no máximo até 30 min depois) para corar a membrana, durante cerca de 5 min. Por fim, passou-se a folha de nitrocelulose por água destilada e deixou-se secar à temperatura ambiente.

RESULTADOS

No processo de extracção das proteínas do pólen, a quantidade de material vegetal utilizada foi a mesma para todas as espécies (0,2 g) à excepção de *P. pinaster* (0,9 g), como se pode observar na tabela II 1.

A recta de calibração da BSA permitiu determinar o conteúdo proteico de cada extracto. A partir desse valor fez-se um cálculo da concentração proteica num grama de material fresco.

A tabela II 1 apresenta a variação das concentrações proteicas entre as amostras, a qual varia entre 2,15 a 73,17 mg/g peso fresco. *U. membranosa* e *P. pinaster* apresentam os valores mais baixos, ao contrário de *C. squarrosus* que surge como a espécie com maior concentração de proteínas no pólen.

Tabela II 1. Quantidade de material vegetal utilizada na extracção e conteúdo proteico de cada extracto de pólen.

Espécie	Quantidade de material (g)	Conteúdo de proteína (µg/ml)	Conteúdo de proteína em mg/g peso fresco
<i>Artemisia argentea</i>	0,2	787,00	39,35 ± 0,82
<i>Carduus squarrosus</i>	0,2	1093,10	54,66 ± 1,45
<i>Carlina salicifolia</i>	0,2	670,30	33,50 ± 0,06
<i>Echium nervosum</i>	0,2	202,60	10,13 ± 0,31
<i>Ricinus communis</i>	0,2	635,90	31,80 ± 0,01
<i>Acacia mearnsii</i>	0,2	242,60	12,13 ± 5,98
<i>Pinus pinaster</i>	0,9	193,67	2,15 ± 9,78
<i>Avena barbata</i>	0,2	1463,48	73,17 ± 3,25
<i>Datura candida</i>	0,2	784,80	39,24 ± 1,90
<i>Urtica membranosa</i>	0,2	137,00	6,85 ± 2,04

Para a obtenção de perfis electroforéticos que permitissem a determinação eficaz da massa molecular das proteínas, fizeram-se diluições seriadas da maioria dos extractos, até à obtenção da quantidade de proteína ideal. Como se pode observar na tabela II 2, e em comparação com a tabela II 1, em *A. mearnsii* e *P. pinaster* as concentrações mantiveram-se. Em relação a *A. mearnsii* foi preparado somente um extracto proteico, dado que para *P. pinaster* foi necessário realizar três extracções por experiência. Mantendo o volume de solvente (tampão fosfato 0,1 M, pH 7), aumentou-se a quantidade de material vegetal

utilizado no processo de extracção, até se obter um extracto com proteína suficiente que permitisse detectar, através de electroforese, as fracções proteicas presentes no pólen.

Tabela II 2. Concentração proteica ($\mu\text{g/ml}$) dos extractos após diluição.

Espécie	Concentração de proteína ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Artemisia argentea</i>	300
<i>Carduus squarrosus</i>	300
<i>Carlina salicifolia</i>	175
<i>Echium nervosum</i>	160
<i>Ricinus communis</i>	190
<i>Acacia mearnsii</i>	242,60
<i>Pinus pinaster</i>	193,67
<i>Avena barbata</i>	365
<i>Datura candida</i>	220
<i>Urtica membranosa</i>	120

Na figura II 6 podemos observar os perfis electroforéticos dos extractos dependendo da quantidade de proteína introduzida por poço. Com a excepção de *C. salicifolia*, *A. mearnsii* e *A. barbata*, para cada espécie são apresentados três perfis por extracto, os quais correspondem a diferentes quantidades de proteína, a proteína ideal (ao centro), e a valores acima ou abaixo desta quantidade. Como havíamos mencionado, realizaram-se três extracções do pólen de *P. pinaster*. Na figura II 6 está documentado o perfil de cada extracto, sendo o terceiro, o mais concentrado e o que proporciona uma melhor detecção das bandas. Relativamente aos ensaios efectuados com *A. mearnsii*, somente estão representados dois perfis, o que corresponde à quantidade ideal, e o que representa uma quantidade inferior a esta. O mesmo acontece com *C. salicifolia*, mas além da amostra cuja quantidade é a ideal, é apresentado outro perfil com valor ligeiramente superior.

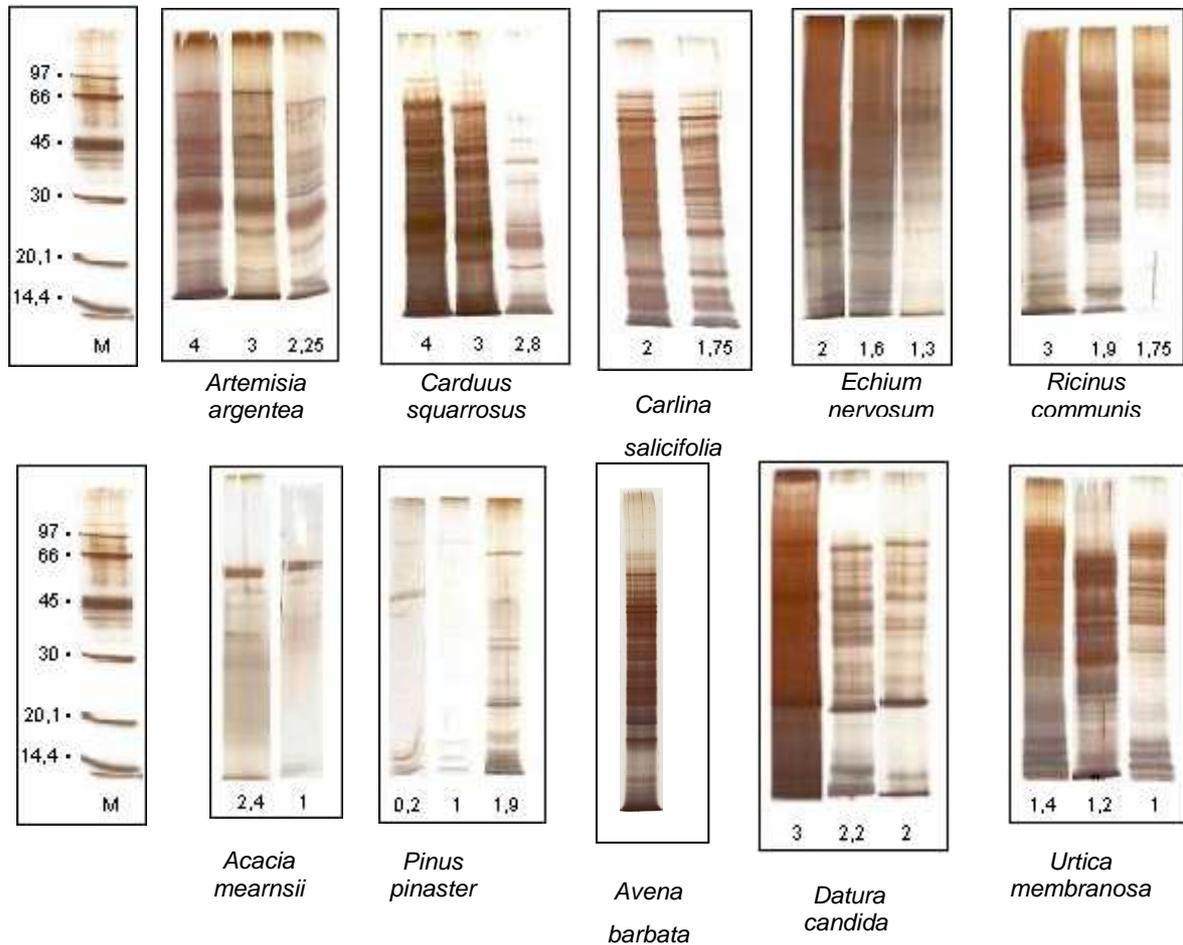


Figura II 6. Perfis electroforéticos dos extractos de cada espécie em função da quantidade de proteína (μg) introduzida no poço. **M**, Marcador de massa molecular (kDa).

A massa dos polipéptidos é dada na tabela II 3. Das dez espécies estudadas, *A. mearnsii* é a planta com menor número de bandas proteicas (9 no total). *D. candida* e *U. membranosa* apresentam 31 bandas, sendo as espécies com maior polimorfismo proteico. Na optimização das técnicas de extracção e electroforética, compararam-se os perfis electroforéticos de amostras tratadas com 2-mercaptoetanol e de amostras tratadas com tioglicol, não tendo sido detectadas diferenças entre os dois perfis obtidos.

Tabela II 3. Massas moleculares (kDa) das proteínas do pólen das espécies estudadas.

Número de Bandas	<i>Artemisia argentea</i>	<i>Carduus squarrosus</i>	<i>Carlina salicifolia</i>	<i>Echium nervosum</i>	<i>Ricinus communis</i>
1	138,33 ± 0,10	150,01 ± 3,24	150,71 ± 2,22	150,01 ± 0,90	144,62 ± 0,92
2	117,10 ± 1,30	94,30 ± 0,09	101,58 ± 3,46	139,63 ± 7,99	119,08 ± 3,33
3	78,40 ± 0,34	67,53 ± 0,09	102,11 ± 3,90	115,91 ± 3,89	83,22 ± 0,01
4	68,37 ± 0,00	56,67 ± 0,13	90,67 ± 4,45	40,54 ± 3,44	70,10 ± 0,73
5	58,02 ± 2,20	50,43 ± 1,13	85,37 ± 0,06	38,40 ± 0,15	62,43 ± 0,01
6	53,89 ± 0,30	45,13 ± 2,45	77,02 ± 11,03	33,68 ± 0,23	57,33 ± 0,01
7	47,98 ± 4,21	43,33 ± 0,02	69,60 ± 2,90	30,27 ± 1,11	55,82 ± 0,00
8	45,52 ± 0,02	41,46 ± 1,21	61,12 ± 1,89	27,93 ± 0,56	52,92 ± 3,40
9	42,26 ± 0,03	40,16 ± 0,11	58,87 ± 3,40	25,35 ± 7,89	50,21 ± 0,54
10	38,90 ± 0,00	36,52 ± 4,81	55,24 ± 0,01	22,35 ± 3,77	45,54 ± 1,13
11	36,52 ± 4,10	31,84 ± 2,01	51,74 ± 0,02	21,07 ± 0,00	43,13 ± 0,00
12	34,94 ± 0,32	29,83 ± 0,01	46,25 ± 0,90	20,22 ± 0,03	40,40 ± 0,30
13	30,09 ± 0,12	25,68 ± 0,89	41,16 ± 0,09	19,70 ± 0,88	38,91 ± 0,91
14	26,78 ± 1,10	23,49 ± 0,02	37,15 ± 2,78	17,40 ± 3,44	36,27 ± 0,01
15	22,57 ± 0,15	22,26 ± 5,23	34,28 ± 0,01	16,54 ± 4,65	33,12 ± 0,03
16	21,81 ± 0,00	21,60 ± 3,22	30,02 ± 3,23		31,60 ± 0,00
17	21,38 ± 1,16	20,59 ± 1,90	26,94 ± 6,02		30,44 ± 7,54
18	20,75 ± 3,34	17,85 ± 0,00	22,76 ± 2,45		28,74 ± 7,86
19	18,12 ± 2,27	16,42 ± 3,56	20,89 ± 0,34		27,29 ± 6,14
20	12,59 ± 0,01	14,86 ± 0,00	19,39 ± 4,45		26,70 ± 7,00
21		13,63 ± 2,66	15,79 ± 2,89		24,59 ± 5,01
22		11,30 ± 4,78	14,83 ± 0,03		
23			13,77 ± 1,08		

(cont.) **Tabela II 3.** Massas moleculares (kDa) das proteínas do pólen das espécies estudadas.

Número de Bandas	<i>Acacia mearnsii</i>	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Avena barbata</i>	<i>Datura candida</i>	<i>Urtica membranosa</i>
1	66,66 ± 4,33	96,59 ± 0,55	111,53 ± 3,56	150,71 ± 0,22	150,71 ± 1,00
2	64,35 ± 1,22	76,58 ± 3,13	105,72 ± 2,11	129,72 ± 2,10	105,56 ± 0,65
3	57,27 ± 5,56	42,02 ± 0,33	91,63 ± 0,45	92,83 ± 0,05	96,09 ± 0,41
4	51,27 ± 0,02	38,61 ± 0,30	84,25 ± 0,01	83,96 ± 0,44	86,18 ± 0,01
5	47,40 ± 3,20	35,70 ± 6,90	77,26 ± 0,05	76,77 ± 0,23	77,96 ± 0,03
6	45,84 ± 3,24	31,82 ± 0,09	71,72 ± 0,10	71,52 ± 0,11	73,96 ± 0,34
7	43,98 ± 0,13	27,45 ± 2,00	63,84 ± 2,89	63,37 ± 0,44	67,74 ± 4,99
8	42,36 ± 1,89	25,31 ± 1,33	58,36 ± 4,89	62,98 ± 0,13	64,83 ± 2,99
9	33,04 ± 0,07	24,79 ± 0,45	54,24 ± 3,90	58,92 ± 3,13	62,08 ± 4,55
10		23,76 ± 4,00	51,82 ± 5,94	55,63 ± 2,99	53,74 ± 5,99
11		23,03 ± 1,41	49,34 ± 0,02	53,21 ± 0,02	50,03 ± 10,3
12		19,82 ± 0,00	46,76 ± 2,11	50,87 ± 2,22	45,42 ± 0,00
13		19,11 ± 0,03	45,71 ± 1,88	47,44 ± 0,01	40,27 ± 9,88
14		18,14 ± 0,00	44,79 ± 7,88	44,58 ± 0,91	38,02 ± 10,3
15		17,40 ± 0,77	43,83 ± 2,00	43,50 ± 0,01	36,28 ± 15,1
16		16,41 ± 5,89	42,2 ± 3,88	39,94 ± 4,89	33,40 ± 0,32
17		15,60 ± 3,01	40,14 ± 4,66	36,50 ± 5,98	30,97 ± 0,21
18			37,31 ± 3,60	35,31 ± 3,77	29,17 ± 0,65
19			33,35 ± 0,09	32,68 ± 4,14	27,72 ± 0,58
20			31,64 ± 0,00	31,64 ± 7,00	25,42 ± 2,83
21			29,61 ± 0,23	29,78 ± 0,01	24,19 ± 3,99
22			28,57 ± 0,44	28,97 ± 0,02	22,88 ± 4,78
23			27,32 ± 4,00	27,11 ± 0,04	21,98 ± 9,00
24			21,74 ± 2,01	25,35 ± 3,35	20,99 ± 6,03
25			20,1 ± 0,01	22,27 ± 4,16	20,16 ± 6,74
26			18,13 ± 0,10	20,81 ± 2,25	19,08 ± 12,9
27				19,89 ± 2,00	17,36 ± 4,62
28				18,40 ± 0,81	16,55 ± 3,12
29				17,51 ± 1,88	15,50 ± 13,3
30				17,03 ± 0,44	13,45 ± 0,37
31				14,69 ± 0,31	12,34 ± 0,01

Nos resultados do *imunoblotting*, 3 soros revelaram reactividade da IgE contra bandas proteicas em 4 das dez espécies de plantas estudadas (Fig. II 7 e Tabela II 4). A idade, o sexo, a IgE total e o tipo de alergia dos utentes do Laboratório Regional de Saúde Pública são apresentados na tabela A 2 (anexo). As massas moleculares das proteínas com especificidade para a IgE foram calculados tendo em conta os pesos dos marcadores

moleculares. As massas destas proteínas encontram-se discriminados na tabela II 4. O soro do paciente 2 (Fig. II 7a) reagiu positivamente a uma proteína de *A. mearnsii* e outra de *C. squarrosus*, com $66,66 \pm 0,13$ kDa e $67,53 \pm 0,29$ kDa, respectivamente. Detectou-se IgE específica para bandas proteicas de *D. candida* em dois indivíduos, 5 e 6 (Fig. II 7b e 7c). Na figura II 7c, é visível a reacção em duas proteínas distintas, com $150,71 \pm 0,05$ e $129,72 \pm 3,41$ kDa, e também uma zona onde se detectou reacção antigénio/anticorpo entre os 92,83 e 58,92 kDa, correspondendo, no SDS-PAGE, a 7 bandas proteicas. O soro do paciente 6 revelou também a presença de anticorpos específicos para 5 proteínas de *P. pinaster*, com massas moleculares compreendidos entre 27,45 kDa e 42,02 kDa. Não se detectou IgE específica no soro dos indivíduos 1, 3, 4, 7 e 8 para as restantes espécies estudadas.

Tabela II 4. Massas moleculares (kDa) das proteínas das espécies estudadas com actividade serológica.

Paciente 2		Paciente 5		Paciente 6	
<i>Acacia mearnsii</i>	<i>Carduus squarrosus</i>	<i>Datura candida</i>	<i>Datura candida</i>	<i>Pinus pinaster</i>	
$66,66 \pm 0,13$	$67,53 \pm 0,29$	$129,72 \pm 0,18$	$150,71 \pm 0,05$	$42,02 \pm 0,05$	
			$129,72 \pm 3,41$	$38,61 \pm 0,46$	
			$92,83 \pm 3,21$ - $58,92 \pm 5,67$	$35,70 \pm 7,78$	
				$31,82 \pm 2,11$	
				$27,45 \pm 0,46$	

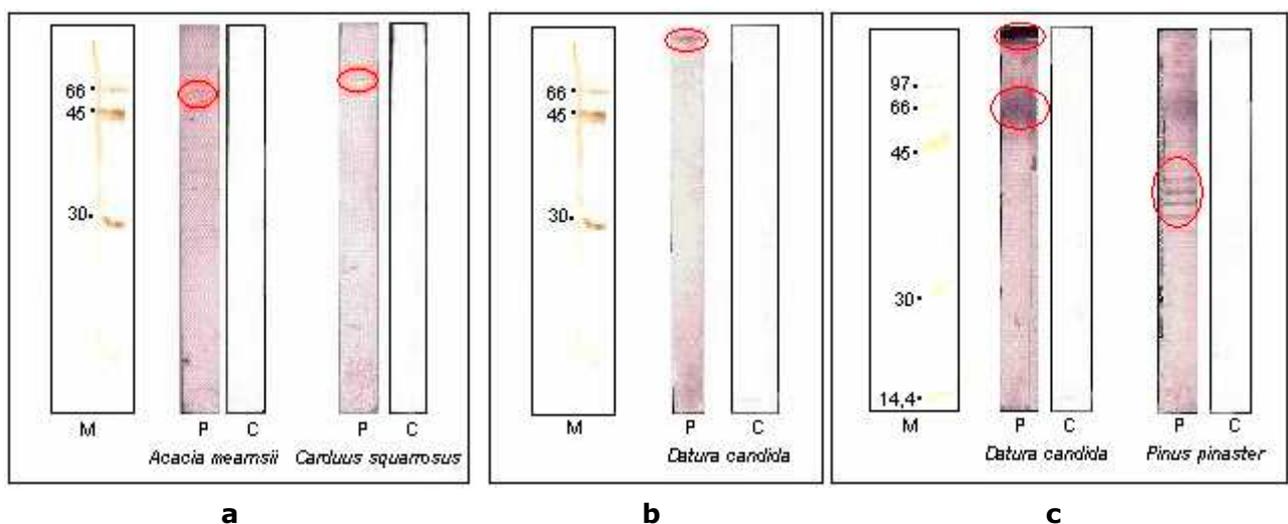


Figura II 7. Proteínas que reagiram positivamente ao soro dos indivíduos: **a** - paciente 2, **b** - paciente 5 e **c** - paciente 6 (**C**, detecção dos alergénios com o controlo; **M**, marcador de peso molecular, kDa; **P**, detecção dos alergénios com o soro do respectivo paciente).

DISCUSSÃO

A optimização das amostras para análise electroforética constitui uma etapa fundamental na identificação dos alergénios de um extracto, sobretudo para espécies acerca das quais não se conhecem estudos do ponto de vista alergológico.

1. O Procedimento de Extração Proteica

Neste trabalho adoptou-se um procedimento de extração que recomenda 90 min de agitação magnética. *P. pinaster* foi a única espécie em que houve necessidade de aumentar este tempo, bem como a quantidade de material vegetal usado na preparação do extracto. Inicialmente adoptaram-se as mesmas condições para todas as espécies, 0,2 g de material em agitação durante 90 min. Como se pode observar na figura II 6, o conteúdo proteico do extracto de *P. pinaster* era insuficiente para que se detectassem bandas no electroforegrama. Num segundo extracto onde se aumentou a quantidade de material para 0,5 g, o resultado também não foi aceitável. O aumento do tempo de agitação para 180 min e a quantidade de material para 0,9 g, permitiu a visualização das proteínas extraídas. Contudo, está documentado que *Pinus* tem um baixo conteúdo proteico, o que corrobora os resultados obtidos (Pettyjohn e Levetin, 1997).

Num estudo realizado com 3 espécies de coníferas, verificou-se que quanto maior o tempo de extração, mais proteínas com diferentes massas ocorre no extracto (Pettyjohn and Levetin, 1997). Verificou-se ainda, na preparação de extractos de pólen, que o tempo de extração nunca é inferior a 60 min (Ford et al, 1985; Nilsen e Paulsen, 1990; Polo et al, 1990; González et al, 2000; Sánchez et al, 2002).

1.1. A Eluição Proteica

Estudos com *Pinus sp.* revelaram a existência de indivíduos com reacção positiva ao seu pólen, contudo, este continua a não ser considerado importante do ponto de vista clínico (Pettyjohn e Levetin, 1997). De acordo com estes autores, há estudos que demonstram que os alergénios de várias plantas são libertados do grão de pólen rapidamente e em grandes quantidades. Esta rápida eluição dos alergénios e o facto dos sintomas de rinite aparecerem 30 s após um teste de provocação nasal sugerem que, em condições naturais, a libertação de alergénios também ocorre rapidamente (Carnés et al, 2002). As partículas aerobiológicas são removidas da zona da nasofaringe em 5-10 min e permanecem na laringe cerca de 20 min, antes de entrarem no tracto gastrointestinal. Por esta razão, a

rápida libertação dos alergénios é um factor importante na reacção alérgica (Pettyjohn e Levetin, 1997). Contudo, há proteínas que se libertam mais rapidamente do que outras. Esta diferença na libertação dos alergénios está relacionada com a localização da proteína no grão de pólen. Os alergénios podem encontrar-se no citoplasma, na exina e na intina. A condição fisiológica da planta e a função biológica dos alergénios pode, por outro lado, determinar a sua presença ou ausência, no grão de pólen, de certos alergénios num dado momento (Knox and Suphioglu, 1996; Carnés et al, 2002).

2. Optimização de Etapas da Caracterização Molecular

A separação electroforética permite determinar o número de proteínas presentes num extracto e identificar o alergénio tendo em conta o seu peso molecular. Com excepção de *A. mearnsii* e *P. pinaster*, houve necessidade de proceder à diluição do extracto inicial das outras espécies, tornando possível a visualização nítida da maioria das fracções proteicas. Como se pode ver na figura II.6, foi possível obter bons padrões electroforéticos. No entanto, no electroforegrama de *E. nervosum* visualiza-se bastante arrastamento (*background*). Na tentativa de o eliminar, o extracto foi filtrado uma segunda vez. Contudo, este procedimento não resultou da mesma forma que para *A. mearnsii*, em que se melhorou substancialmente a visualização das proteínas do pólen deste extracto, após filtragem.

Como havíamos mencionado na metodologia, a electroforese decorreu segundo Laemmli, ou seja, num sistema de tampões descontínuos e na presença de SDS. Na SDS-PAGE, as proteínas são desnaturadas por acção do calor na presença de SDS e de um agente redutor, neste caso o 2-mercaptoetanol. Deste modo, as proteínas são separadas de acordo com o seu peso molecular, que é facilmente determinada por comparação da sua mobilidade com o marcador (Hames, 1981). Todavia, o uso de técnicas de separação como o SDS-PAGE, antes do *immunoblotting*, pode prejudicar a caracterização dos alergénios. A desnaturação, devido ao calor, e a quebra das ligações bissulfito, por acção do 2-mercaptoetanol, são o principal problema (Hames, 1981). Quando os epítomos (locais específicos para a ligação da IgE) são conformacionais (dependem da estrutura terciária da molécula), o processo de desnaturação compromete a capacidade de ligação do alergénio à IgE. Quando o alergénio é um dímero com ligações bissulfito, o uso de agentes redutores pode, neste caso, dar origem a uma sobrevalorização do número de alergénios presentes no extracto, se em ambos os monómeros estiverem presentes epítomos (Ipsen e Larsen, 1986).

3. Polimorfismo Proteico

Quanto ao polimorfismo proteico das espécies estudadas, só é possível comparar com dados bibliográficos os resultados obtidos de *R. communis*. À exceção de *Pinus pinaster*, não foram encontradas referências que abordem a caracterização bioquímica dos extractos alergénicos das restantes espécies. Bahrman et al (1997) preconizaram um estudo da genética de *P. pinaster*, no qual descreveram os padrões proteicos do pólen obtidos com diferentes métodos de extracção.

As características físico-químicas da maior parte dos alergénios do pólen de *R. communis* foram descritas por García-González et al (1999). Nesse trabalho foi feito um estudo aerobiológico em Málaga e onde se demonstrou a existência de indivíduos com alergia respiratória a este pólen. A composição proteica do extracto do pólen foi analisada em SDS-PAGE e por IEF. Foram descritas 22 bandas com pesos moleculares entre 88 e 13 kDa, e pontos isoeléctricos a variar entre 6,8 e 4,0. Neste trabalho foram contabilizadas 20 bandas proteicas com massas moleculares a variar entre $144,62 \pm 0,92$ e $24,59 \pm 5,01$ kDa. Um dado a ter em conta neste tipo de estudos é o da heterogeneidade de massa de uma proteína, que pode ser atribuída ao polimorfismo na sequência ou a modificações post-traducionais, como a glicosilação, ambas características muito comuns entre os alergénios (Ayuso et al, 1993).

4. Análise de *Imunoblotting* referente às distintas fontes alergénicas

4.1. Asteraceae

As **Asteráceas** têm um papel importante na sensibilização alérgica. *Ambrosia*, *Xanthium* e *Artemisia* são os 3 géneros de maior relevância. *Ambrosia artemisifolia* e *A. trifida* são responsáveis por mais de metade dos casos de rinite alérgica sazonal nos Estados Unidos. *Artemisia vulgaris* constitui uma das principais causas de reacções alérgicas no final do Verão na Europa e constitui o arbusto predominante do NE, WE e E europeu (Nilsen e Paulsen, 1990; Egger et al, 2004; Stumvoll et al, 2004). Foram isolados quatro alergénios nesta espécie, sendo os dois primeiros, os alergénios Art v 1 e Art v 2, com uma massa molecular de 60 kDa e 35 kDa, respectivamente (Nilssen e Paulsen, 1990; Nilsson, 1990; López, 1999; Miltgen et al, 2001). No entanto, a informação disponível é discordante quanto ao peso molecular de Art v 1, cuja identidade bioquímica corresponde ao de uma proteína de defesa (Gadermaier et al, 2004). Segundo Nilsen e Paulsen (1990) a análise em SDS-PAGE revela um alergénio de 60 kDa. De acordo com Clavero (2002) a massa molecular de Art v 1 oscila entre 27 e 29 kDa. Em relação a Art v 2 os valores são mais

semelhantes. Para Nilsen e Paulsen (1990), o alergénio tem cerca de 35 kDa e para Clavero (2002) a massa molecular varia entre 34-38 kDa. Por seu turno, Art v 3 representa uma proteína de transferência de lípidos e Art v 4 uma profilina, com uma massa molecular de 12 kDa e 14 kDa, respectivamente (Tavares e Todo-Bom, 2004). O estudo da composição proteica da parede polínica de **A. argentea** por PAGE e SDS-PAGE revelou a presença de duas proteínas de 14,5 e 15,5 kDa, com massas a variar entre os 89,1 e 94 kDa. A extracção e separação cromatográfica por exclusão molecular confirmou a presença destas proteínas, e detectou outras três de 17, 41,6 e 66 kDa (Câmara et al, 1996).

C. squarrosus tem uma polinização do tipo zooidófila e provavelmente, o número de indivíduos sensibilizados aos alergénios deste pólen é muito reduzido. Segundo Behrendt and Becker (2001), a fonte de alergénios com maior importância no meio ambiente, é o pólen das plantas anemófilas. Tal como em *A. argentea*, constatou-se a existência de um polimorfismo molecular específico da fracção proteica da parede polínica de *C. squarrosus* e **Carlina** sp (Pinheiro de Carvalho et al, 1998; Branco et al, 2001). Comparativamente a outras *Cynareae* endémicas, *C. squarrosus* apresenta valores médios de conteúdo proteico na parede polínica. Para além das composição bioquímica do grão de pólen, a disposição da camada de *pollenkitt*-trifina e a presença de um sistema de espinhos e de *caveae* bem desenvolvidos, reforçam o carácter zooidófilo desta espécie (Pinheiro de Carvalho et al, 2003; Susete et al, 2003). Todavia, a alergenicidade de *Carduus squarrosus* não está ainda documentada.

Não se obtiveram resultados positivos, e não foram encontradas referências quanto à alergenicidade de **Carlina** sp.

4.2. **R. communis** (Euphorbiaceae)

Segundo García-González et al (1999), são poucos os estudos acerca da alergenicidade do pólen de **R. communis**. Os trabalhos existentes focam sobretudo a reactividade cruzada entre alergénios de diferentes partes da planta (semente, folhas, pólen), ou a reactividade cruzada com alergénios do pólen de outras espécies. Estes investigadores identificaram por *immunoblotting* 13 bandas com massas moleculares entre 67 e 14,5 kDa. Duas destas proteínas, com 14,5 e 15,5 kDa, reagiram com o soro de um grande número de pacientes.

Apesar de não se ter verificado actividade serológica das proteínas do pólen de *R. communis*, tratar-se de uma planta muito frequente na Madeira, e como tal seria interessante investigar para esta população, a prevalência de sensibilização a este pólen.

4.3. *A. mearnsii* (Fabaceae)

Através do *imunoblotting* foi identificada uma proteína do pólen de *A. mearnsii* com uma massa molecular de 66,66 kDa. O soro do mesmo paciente identificou também uma proteína de *C. squarrosus* com 67,53 kDa. Moreno-Escobosa et al (2001) descreveram um caso de rinite e asma ocupacional devido ao pólen de acácia. O mecanismo responsável pelos sintomas era mediado pela IgE, demonstrado mediante teste em *Prick* e determinação da IgE específica. A SDS-PAGE-*Imunoblotting* demonstrou a existência de uma banda proteica de 20 kDa fixadora de IgE. Surgiram outras bandas na ordem dos 55 kDa, 35 kDa, 18 kDa e 16 kDa, embora sem reactividade para com a IgE.

No entanto, está documentada a existência de reactividade cruzada entre alergénios de *Acacia sp.* e de gramíneas (Howlett et al, 1982; Weber, 2003). No soro deste indivíduo, não foi detectada IgE específica para alergénios de gramíneas (ou através do teste múltiplo gx1), o que poderá indicar que, neste caso, a reacção a proteínas de *A. mearnsii* não está relacionada com a referida reactividade cruzada. À semelhança de *R. communis*, *A. mearnsii* apresenta uma distribuição muito frequente na Madeira, nomeadamente na cidade do Funchal. Dado que os seus níveis polínicos têm vindo a aumentar nos últimos anos (comunicação pessoal), seria também interessante investigar, para esta população, a prevalência de sensibilização a este pólen.

4.4. *P. pinaster* (Pinaceae)

4.4.1. (Aero)biologia e alergenicidade

Vários estudos aerobiológicos efectuados em regiões com áreas de pinhais demonstraram que o pólen de *Pinus sp.* é bastante abundante na atmosfera. Contudo, as altas concentrações polínicas não significam uma elevada prevalência de alergia a este pólen. De todos os pacientes com sintomatologia alérgica que residem nessas zonas, apenas uma pequena percentagem revela sensibilização a *Pinus sp.* (García-Ortega e Soler, 2002). De acordo com Pettyjohn e Levetin (1997), não é comum o pólen de *Pinus sp.* ser responsável pelo aparecimento de sintomatologia alérgica, apesar de haver vários estudos onde se demonstra que os testes cutâneos realizados com extracto de pólen deste género são positivos. Há várias hipóteses que justificam a sua hipoalergenicidade. Alguns autores consideram que a camada de cera que cobre o pólen, retarda o processamento dos alergénios. Outros sugerem que o pólen de *Pinus sp.* é demasiado grande para entrar nas vias respiratórias, apesar de estar documentada a sua presença no tracto respiratório. Há ainda investigadores que sugerem que o seu baixo conteúdo proteico o torna pouco

alergénico. Num trabalho realizado por Pettyjohn e Levetin (1997), a análise comparativa da solubilidade das proteínas do pólen de algumas coníferas, revelou que nos primeiros minutos de extracção, *Pinus echinata* era a espécie que libertava menos alergénios. A análise da quantidade de lípidos extraídos do grão de pólen demonstrou que *P. echinata* contém 10 vezes mais lípidos do que as outras espécies estudadas (*Juniperus ashei* e *J. virginiana*). Segundo os autores, este resultado parece suportar a hipótese de que a camada de cera do pólen de *Pinus* sp. está relacionada com a sua hipoalergenicidade. A existência deste invólucro retarda a libertação dos alergénios, e como tal, diminui a alergenicidade. Paralelamente, especulou-se acerca da acção de esterases do pólen de *Pinaceae* nos mecanismos alergénicos. Hipoteticamente, a presença de elevadas quantidades destas enzimas e de partículas poluentes poderá induzir uma resposta alérgica (Alaimo et al, 1997).

4.4.1. Actividade serológica

No soro de um dos pacientes foi detectada IgE específica para 5 bandas proteicas de *P. pinaster*. Estas proteínas apresentam um peso molecular de $42,02 \pm 0,05$; $38,61 \pm 0,46$; $35,70 \pm 7,78$; $31,82 \pm 2,11$ e $27,45 \pm 0,46$ kDa. Pettyjohn e Levetin (1997) fazem referência a um estudo acerca do pólen de algumas coníferas. Nesse trabalho foram também identificados, por *imunoblotting*, 2 alergénios no pólen de *P. echinata*, com uma massa molecular de 45,50 e 66 kDa. Num outro estudo de *imunoblotting*, foram detectadas no pólen de *P. radiata*, duas bandas fixadoras de IgE, com 52 e 70 kDa (Garcia-Ortega e Soler, 2002). Weber (2003) refere a existência de reactividade cruzada entre *Lolium perenne* e *P. radiata*. Contudo, na bibliografia existente não é possível determinar até que ponto as proteínas de *P. pinaster* estarão relacionadas com as gramíneas. Foi ainda documentado a ocorrência de mecanismos de hipersensibilidade imediata devido ao pólen de *Pinus* em indivíduos ocupacionalmente expostos (Vega et al, 1999; Skovsted et al, 2003).

4.5. *D. candida* (Solanaceae)

Como foi mencionado, o pólen anemófilo assume um papel importante na sintomatologia alérgica. Porém, há espécies com polinização do tipo entomófilo consideradas alergénicas, como por exemplo, *Helianthus annuus* e *Taraxacum* sp. (Asteraceae) (Clavero, 2002). A exemplo de *Datura* sp., seria interessante proceder à caracterização bioquímica do extrato

proteico do pólen de plantas ornamentais cuja introdução em zonas urbanas tem vindo a aumentar, potenciando o aumento da sensibilização polínica (Valero et al, 1999).

Relativamente a ***D. candida***, não se conhecem estudos desta natureza. No soro de 2 pacientes (amostras 5 e 6), foi detectada IgE específica para algumas bandas proteicas desta espécie.

4.6. *U. membranosa* (Urticaceae)

Sendo considerado um tipo polínico com pouca relevância alérgica, contribui em termos percentuais de modo significativo para o total polínico anual de uma região. Da análise aerobiológica do Funchal, verifica-se uma elevada concentração de pólen de **Urticaceae** (ver cap. I, pág. 99). Em nenhum dos soros se detectou IgE específica para proteínas de *U. membranosa*. Foi documentada reactividade cutânea positiva a extratos de pólen de *Urtica dioica* e *U. lyalli* em indivíduos atópicos expostos (Platt-Mills e Solomon, 1998). Foi igualmente detectada IgE específica a *Urtica* devido à sensibilização ocupacional, para além de induzir frequentemente asma, rinite alérgica e conjuntivite alérgica (Steinman e Ruden, 2005). O facto deste tipo polínico apresentar uma dinâmica de variação aerobiológica que oscila de ano para ano e uma presença contínua na atmosfera, potenciada pela distribuição próxima à presença humana (Belmonte et al, 1999), constituem *per se*, razões que justificam uma vigilância aerobiológica constante. A caracterização de novos extractos alérgicos de pólen de *Urtica* é igualmente importante, bem como o conhecimento do grau de sensibilização que eventualmente possa ocorrer.

CONCLUSÕES

- Foram apuradas três técnicas distintas para a obtenção dos perfis proteicos de extractos de pólen desde a sua fonte natural. Basearam-se na optimização dos procedimentos de extracção, no desenvolvimento de ensaios de doseamento proteico e na separação electroforética sob condições desnaturantes.
- A quantidade de amostra biológica e o tempo implicados no procedimento de extracção, resultam importantes na definição da composição do extracto. Igualmente implicado está, o processo de eluição dos alergénios, o qual, em condições naturais constitui um factor importante na reacção alérgica.
- Obtiveram-se extractos de pólen de 6 plantas acerca das quais não se conheciam estudos desta natureza: *Acacia mearnsii*, *Avena barbata*, *Carduus squarrosus*, *Carlina salicifolia*, *Datura candida* e *Echium nervosum*.
- A análise electroforética revelou a existência de um elevado polimorfismo molecular, como no caso de *U. membranosa*, *D. candida* e *A. barbata*.
- Os soros individuais permitiram identificar proteínas de *Pinus pinaster* de massas moleculares de 42,02; 38,61; 35,70; 31,82 e 27,45 kDa. Identificaram-se igualmente proteínas com reactividade frente à IgE nos extractos de *A. mearnsii* e *C. squarrosus* com massas moleculares de 66 e 67 kDa, respectivamente.
- Em *D. candida* identificaram-se proteínas com actividade serológica com massas moleculares a variar entre 150,71 e 58,92 kDa. Uma fracção proteica de 129,72 kDa reagiu positivamente no soro de dois indivíduos.
- Nos extractos de *E. nervosum*, *R. communis*, *A. argentea*, *C. salicifolia* e *U. membranosa* não se identificaram proteínas com actividade serológica.
- A ampla difusão de espécies como *R. communis*, *Urtica spp.* ou *A. mearnsii* e sua proximidade à presença humana, reforçam, por um lado, a importância da vigilância aerobiológica, e por outro lado, requerem uma definição do seu carácter alergénico para a população desta região.

REFLEXÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A segunda parte deste trabalho é respeitante à caracterização bioquímica dos alergénios polínicos mais frequentes detectados durante o período 2002-2004. A conjugação deste tipo de estudos com a análise aerobiológica permite a aferição de *taxa* com potencial alergénico. Não obstante, refere-se os aspectos a ter em conta no prosseguimento deste tipo de estudos:

1. Redimensionamento da amostra populacional

A amostra populacional deverá albergar o maior número de pacientes possível, de forma a ter significado estatístico e considerar-se o valor das IgE específicas frente a pólenes.

2. O complemento da informação aerobiológica

A informação fornecida pela monitorização aerobiológica pode ajudar na selecção de alergénios no procedimento diagnóstico do doente alérgico. Tendo em conta a crescente exposição de novas fontes alergénicas e a necessidade de recorrer a extractos padronizados, importa incluir na bateria *standard* de aeroalergénios para testes cutâneos, os extractos epidemiologicamente mais relevantes para esta região. Tal será particularmente útil, por exemplo, no acompanhamento dos pacientes com manifestações clínicas sazonais.

2. Metodologia de caracterização de alergénios

O conhecimento alergénico do pólen destas ou de outras espécies será aprofundado se aplicadas técnicas adicionais para a caracterização dos alergénios, que venham permitir um maior rendimento e eficiência na purificação dos componentes. A técnica de *immunoblotting* constitui um ponto de partida para tal, na medida em que permite detectar anticorpos específicos para componentes alergénicos. As técnicas adicionais de purificação e isolamento dos alergénios polínicos podem incluir, por exemplo, a cromatografia líquida de alta resolução (*HPLC*) e a cromatografia de afinidade com anticorpos monoclonais.

2.1. Os procedimentos de extracção

O modo de libertação dos alergénios polínicos corresponde a um factor importante na reacção alérgica. Como tal, seria interessante adoptar procedimentos de extracção que nos permita modular a forma de libertação dos alergénios, ajudando a compreender a sua acção *in vivo*.

2.2. Composição dos extractos naturais

As descrições dos perfis proteicos de extractos comerciais por vezes revelam diferenças com relação a extractos naturais. Nestes últimos, a presença de proteínas específicas, com pouco ou nenhuma expressão nos extractos comerciais pode explicar a inconsistência dos testes *in vitro*, ficando por elucidar a relevância de tais proteínas na sensibilização.

O contributo desta linha de investigação deverá cingir-se à caracterização molecular preliminar de novos extractos de pólen e disponibilizar dados adicionais sobre o conteúdo proteico dos mesmos. Nesta lógica, seguir-se-ia a caracterização dos alergénios maioritários, sua composição aminoácida, e, numa última instância, a aferição do seu significado biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaschener X, Crespo JF e Pascual CY (1998) Specific IgE to recombinant vegetal panallerg (rBet v 2) and fruit allergy in pollinic patients. *Allergy* **53**: 614-618.
- Agarwal MK, Swanson MC, Reed CE e Yunginger JW (1984) Airbone ragweed allergens: association with various particle sizes and short ragweed plant parts. *J Allergy Clin Immunol.* **74**: 687-93.
- Ahlstedt S (2002) Understanding the usefulness of specific IgE blood tests in allergy. *Clin Exp All.* **32**: 11-16.
- Alaimo MG, Li Vigni I e Melati MR (1997) Presence of esterase in *Pinaceae* pollen. *Aerobiologia* **13**: 117-120.
- Alfacedo JIS (1997) Purificação e caracterização de proteínas, em: Halpern MJ (Ed.), *Bioquímica*, Lidel, Lisboa, pp. 93-111.
- Arcalís E, Câmara I, Vicens N, Marquez J e Suárez-Cervera M (1998) Ultrastructural localization of proteins in the pollen grains of *Prunus* consumed by bee larvae. Congress Pollen and Spores. Morphology and Biology, The Royal Botanic Gardens, Kew and The Natural History Museum, London. Abstract Book.
- Arilla MC, Ibarrola I, Eraso E, Martínez A e Asturias JA (2002) Inmunoensayo para la cuantificación de Dac g 1 en extractos de polen. *Alergol. Inmunol. Clin.* **17**: 231-237.
- Arshad SH (2002) *Allergy—An illustrated colour text*, Churchill Livingstone, London. pp.13.
- Ayuso R, Carreira M, Lombardero M e Duffort O (1993) Isolation by mAb based affinity chromatography of two Par j 1 isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties. *Molec Immunol.* **30**: 1347-54.
- Azinheira MP e Castro RM (1998) Diagnóstico laboratorial em microbiologia, em: Ferreira WF e Sousa JC (Eds) *Microbiologia – Vol. I*, Lidel, Lousã, pp. 80-92.
- Bahrman N, Plomion C, Petit RJ e Kremer A (1997) Contribution of two-dimensional electrophoresis of proteins to maritime pine genetics. *Ann Sci For* **54**: 225-236.
- Baldo BA (1983) Standardization of allergens. *Allergy* **38**: 535-546.
- Baldo BA e Bass DJ (1990) Standardization of grass pollen allergens: the spectra of pollen allergens from six common grasses. *Review of Palaeobotany and Palinology.* **64**: 87-95.
- Behrendt H e Becker W (2001) Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Current Opinion in Immunology* **13**: 709-715.
- Behrendt H, Becker WM, Friedrichs KH e Darsow U (1992). Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter. *Int Arch Allergy Immunol* **99**: 425-428.

- Behrendt H, Tomczok J, Sliwa-Tomczok W e Kasche A (1999) Timothy grass (Phleum pratense L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. *Int Arch Allergy Immunol.* **11**: 414-8.
- Belmonte J, Canela M, Guàrdia R, Guàrdia RA, Sbai L, Vendrell M, Alba, Alcázar P, Cabezudo B, Gutiérrez M, Méndez J e Valência R (1999) Aerobiological dynamics of the Urticaceae pollen in Spain, 1992-98. *Polen* **10**: 79-91.
- Bio-Rad Bulletin 1600 EG. Maximize Sensitivity with the Amplified Alkaline Phosphatase Immun-Blot Assay Kit. Bio-Rad Laboratories, Inc.
- Blattler DP, Bradley A, Vanslykek K e Garner F (1972) Quantitative electroforesis in polyacrylamide gels of 2 – 40 percent. *Journal of chromatography* 64 (**1**): 147-152.
- Blum H, Beier H e Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Branco MIJ, Suzete F, Câmara IG, Pinheiro de Carvalho MÂA e dos Santos TMM (2001) Identification of pollen wall specific proteins in some Madeira endemic *Cynarae* species em: MÂA Pinheiro de Carvalho, G Costa, JJ Abreu, DM Rodrigues (eds.) *Proceedings of I Symposium of Island Ecosystems Conservation and Molecular Approach*. Abstract Book. University of Madeira, CEM, Funchal, pp. 167-173.
- Câmara IG, Pinheiro de Carvalho MÂA e Ornelas I (1996) Extraction and Molecular Characterization of Pollen Wall Proteins of *Asteraceae* Species from Madeira's Flora. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. Special Issue of 10th Congress of FESPP. 62 p.
- Câmara R, Câmara I, Oliveira S, Carvalho MÂ e Drummond Borges F (2001) Colheita de Pólenes no Funchal. Comparação de Metodologias. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* (9) **2**: 178.
- Cariñanos P, Prieto JC, Galán C e Domínguez E (2001) Solid Suspended Particles Affecting the Quality of Air in Urban Environments. *Bull Environ. Contam.* **67**: 385-391.
- Carnés J, Fernández-Caldas E, Boluda L, Casanovas M, Sastre J, Bernal M e Blanca M (2002) Rapid release of Ole e 1 from olive pollen using different solvents. *Allergy* **57**: 798-804.
- Centner J e Weck AL (1995) *Atlas of Immuno-allergology*, 3th Ed., Hogrefe & Huber Publishers, Germany, pp. 186.
- Clavero MG (2002) Compuestas/Asteráceas em: Santiago AV and García AC (Eds) *Polinosis. Polen y Alergia*, MRA Ed. S.L. Laboratorios Menarini S.A., Barcelona, pp. 53-68.
- Coll AR (1998) Enzimoinmunoanálisis em: Arderiu XF, Lacambra MJC and Compañó JM (Eds) *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*, vol. I, 2^a Ed., Editorial Reverté, Barcelona, pp. 347-364.

- Colombo P, Duro G, Costa MA, Izzo V, Mirisola M, Locorotondo G, Cocchiara R e Geraci D (1998) *Parietaria* pollen allergens. *Allergy* **53**: 917-921.
- D'Amato G, Liccardi G, Russo M e D'Amato M (2000) On the interrelationship between outdoor air pollution and respiratory allergy. *Aerobiologia* **16**: 1-6.
- D'Amato G, Spieksma FT e Bonini S em: *Allergenic pollen and pollinosis in Europe* (1991) Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- D'Amato G e Liccardi G (2002) The increasing trend of seasonal respiratory allergy in urban areas. *Allergy* 57 (Suppl. **71**): 35-36.
- Desqueyroux H, Pujet J-C, Prosper M, Squinazi F e Momas I (2002) Short-Term Effects of Low-Level Air Pollution on Respiratory Health of Adults Suffering from Moderate to Severe Asthma. *Environmental Research Section A* **89**: 29-37.
- Díez de Celis C (1998) Electroforesis em: Arderiu XF, Lacambra MJC and Compañó JMQ (Eds) *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*, vol. I, 2ª Ed., Editorial Reverté, Barcelona, pp. 169-180.
- Egger M, Woptner N, Himly M, Dedic A, Bauer R, Mari A, van Ree R, Hant A, Thalhamer J e Ferreira F (2004) Art v 1, the Major Mugwort Allergen, Cross-React with Proteins Originating From Compositae and Grass Pollen. *J Allergy Clin Immunol*, S300, Abstracts.
- Fahlbusch B, Müller W-D, Rudeschko O, Jäger L, Cromwell O e Fiebig H (1998) Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. *Clin Exp All.* **5**: 235-247.
- Fasce L, Tosca MA, Olcese R, Milanese M, Erba D e Ciprandi G (2004) The natural history of allergy: the development of new sensitizations in asthmatic children. *Immunology* **93**: 45-50.
- Fernvick E, Peltre G, Sénéchal H e Vargaftig (2002) Effects of birch pollen and traffic particulate matter on Th2 cytokines, immunoglobulin E levels and bronchial hyper-responsiveness in mice. *Clin Exp All.* **32**: 602-611.
- Ford SA, Tovey ER e Baldo BA (1985) Identification of Orchard grass (*Dactylis glomerata*) pollen allergens following electrophoretic transfer to microcellulose. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **78**: 15-21.
- Freile MBC (2001) Caracterización Molecular e Inmunoquímica del Alergeno Principal del Polen de *Plantago lanceolata*, Pla I 1. Aplicación a la estandarización de extractos alergénicos. Tese de doutoramento. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. pp. 144.
- Gadermaier G, Dedic A, Obermeyer G, Frank S, Himly M e Ferreira F (2004) Biology of weed pollen allergens. *Current Allergy and Asthma Reports* **4**: 391-400.
- Galli SJ e Lantz CS (1999) Allergy em: William, P.E. (Eds), *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1127-1142.

- García-González JJ, Bartolomé-Zavala B, Trigo-Pérez MM, Barceló-Muñoz JM, Fernández-Meléndez S, Negro-Carrasco MA, Carmona-Bueno MJ, Vega-Chicote JM, Muñoz-Román C, Palacios-Peláez R, Cabezudo-Artero B e Martínez-Quesada J (1999) Pollinosis to *Ricinus communis* (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study. *Clin Exp All.* **29**: 1265-1275.
- García-Ortega P e Soler JB (2002) Pinos in Santiago AV, García AC (Eds) *Polinosis. Polen y alergia*, MRA Ed. S.L. Laboratorios Menarini S.A., Barcelona, pp. 139-142.
- Geraldés L, Todo Bom A, Rodrigues F, Cunha R e Chieira C (2004) Gramineae sensitization in Central Portugal. Summer Course 2004 - Aerobiology and Environment, Madeira, Funchal, Abstracts Book.
- González EM, Villalba M e Rodríguez R (2000) Allergenic cross-reactivity of olive pollen. *Allergy* **55**: 658-663.
- Granum B, Gaarder PI e Lovik M (2001) IgE adjuvant effect caused by particles - immediate and delayed effects. *Toxicology* **156**: 149-159.
- Hames BD (1981) An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis em: Hames, BD and Rickwood D (Eds) *Gel electrophoresis of proteins - A practical approach*, IRL press, Oxford, pp. 1-91.
- Heutelbeck A, Ahrens T, Hallier E e Schulz TG (2003) Comparison of dog allergens in commercial and self-prepared extracts with special attention to different breeds. EAACI 2003, The ALK-Abelló Company Sponsored Symposium. Abstracts Booklet, pp. 18.
- Holmquist L, Weiner J e Vesterberg O (2001) Airborne birch and grass pollen allergens in street-level shops. *Indoor Air* **11**: 241-245.
- Howlett BJ, Hill DJ e Knox (1982) Cross-reactivity between Acacia (wattle) and rye grass pollen allergens. *Clinical & Experimental Allergy* **12 (3)**: 259.
- Ipsen H e Larsen JN (1986) Detection of antigen-specific IgE antibodies in sera from allergic patients by SDS-PAGE-immunoblotting and crossed radioimmunoelectrophoresis. *Handbook of Immunoblotting of Proteins*, vol. II, pp. 159-166
- Johansson S, Hourihane J, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski M, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M e Wüthrich B (2001) A revised nomenclature for allergy. *Allergy* **56**: 813-824.
- King TP, Hoffman D, Lowenstein H e Marsh DG (1995) Allergen nomenclature. *Clin Exp Allergy* **25**: 27-37.
- Knox B e Suphioglu C (1996) Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends in Plant Science* **1 (5)**: 156-164.
- Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL e Bursill LA (1997) Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp All.* **27**: 246-251.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- López FM (1999) *Alergia respiratoria en la infancia y adolescencia*, 2ª Ed., Springer – Verlag Ibérica, Barcelona, pp. 323.
- Lopez M e Lehrer SB (1995) Indoor pollution and asthma. XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology, Madrid.
- Lowry OH, Rosebourg NJ, Farr AF e Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **139**: 265-275.
- Lund O, Nielsen M, Lundegaard C, Keşmir C e Brunak S (2005) *Immunological Bioinformatics*. The MIT Press, Cambridge. pp. 296.
- Madsen C (1997) Chemicals in food and allergy, fact and fiction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **4**: 115-120.
- Manual de Imunoalergologia 2004/2005, PHARMACIADiagnostics.
- Matthiesen F e Schumacher M (1991) Characterization of the major allergen of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen Cyn d 1. *J Allergy Clin Immunol* **88**: 763-74.
- Miltgen J, Marotel C, Cuguillière A, Nguyen H, Thuy G, Verrot D e Bonnet D (2001) Allergie et voyage. *Allergol. Immunol. Clin.* **41**: 493-503.
- Moreno-Escobosa MC, Rubira N, Ausín A, Amat P, Martínez M, Lluch M, Malet A e Bartolomé B (2001) Asma ocupacional por polvo de acacia. *Alergol Inmunol Clin.* **16**: 233-236.
- Mutius E (2000) The environmental predictors of allergic disease. *Current Reviews of Allergy and Clinical Immunology* 105 (**1**): 9-19.
- Neijens HJ e Dreborg S (1995) Allergen exposure and development of atopic diseases, progress and challenges. *Pediatr Allergy Immunol* 6 (Suppl. **71**): 5-7.
- Nielsen BM e Paulsen BS (1990) Isolation and characterization of a glycoprotein allergen, Art v II, from pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.). *Molecular Immunology* 27 (**10**): 1047-1056.
- Nilsson S (1990) Regional and global distribution of aeroallergens. *Review of Paleobotany and Palinology* **64**: 29-34.
- Nunes (2005) "Rasterio da Doença Alérgica – O Estudo Alergológico." Acção de Formação promovida pela Associação Portuguesa dos Médicos de Clínica Geral – Delegação Regional da Madeira, 17 de Junho de 2005.
- Palma-Carlos AG (1995) Pollinosis in Portugal. XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology, Madrid.
- Park GM, Lee SM, Lee IY e Ree HI (2000) Localization of a major allergen, Der p 2, in the gut and faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* **30**: 1293-7.
- Pettyjohn ME e Levetin E (1997) A comparative study of conifer pollen allergens. *International Journal of Aerobiology* **13**: 259-267.
- Pharmacia Diagnostics, 2003. Manual de Imunoalergologia, UniCAP®.

- Pinheiro de Carvalho MÂA, Câmara IG, Ornelas IR e dos Santos TM (1998) Contributo para o Estudo Palinológico das *Lactucoideae* Endémicas da Flora da Madeira. *III Symposium Fauna and Flora of the Atlantic Islands*. Ponta Delgada. 132 p.
- Pinheiro de Carvalho MÂA, Câmara IG e Brandão RMA (2003) A Palinoecological Study in *Carduus squarrosus* (D.C.) Lowe and *Artemisia argentea* L'Her (Asteraceae em: MÂA Pinheiro de Carvalho, G Costa, JJ Abreu, DM Rodrigues (eds.) *Proceedings of I Symposium of Island Ecosystems Conservation and Molecular Approach*. University of Madeira, CCBG. 62-67.
- Platt-Mills TAE e Solomon W (1998) Aerobiology and Inhalant Allergens, p. 367-403 em: [Eds Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW e Busse WW] *Allergy Principles and Practice* Vol. II, 5th Ed. Mosby.
- Polo F, Ayuso R e Carreira J (1990) HPLC purification of the main allergen of *Parietaria judaica* pollen. *Molecular Immunology* **27**: 151-157.
- Ramadour M, Burel C, Lanteaume A, Vervloet D e Charpin D (2000) Prevalence of asthma and rhinitis in relation to long-term exposure to gaseous air pollutants. *Allergy* **55**: 1163-1169.
- Rantio-Lehtimäki A, Viander M e Koivikko A (1994) Airborne birch-pollen antigens in different particle sizes. *Clin Exp Allergy* **24**: 23-8.
- Salvi S (2001) Pollution and allergic airways disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **1**: 35-41.
- Sánchez JC, Iraola VM, Sastre J, Florido F, Boluda L e Fernández-Caldas E (2002) Allergenicity and immunochemical characterization of six varieties of *Olea europaea*, *Allergy* **57**: 313-318.
- Schäppi GF, Taylor PE, Kenrick J, Staff IA, Suphioglu C (1998) Predicting the grass pollen count from meteorological data with regard to estimating the severity of hayfever symptoms in Melbourne (Australia). *Aerobiologia* **14**: 29-37.
- Schäppi GF, Taylor PE, Staff IA, Rolland JM e Suphioglu C (1999) Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy* **54**: 478-483.
- Schumacher MJ, Griffith RD e O'Rourke MK (1988) Recognition of pollen and other particulate aeroantigens by immunoblot microscopy. *J Allergy Clin Immunol* **82**: 608-16.
- Silva SL, Alves RR, Santos AS, Pregal A, Mendes A, Pedro E, Palma-Carlos G, Ferreira MB, Maria MC e Barbosa MP (2005) Alergia ao cipreste. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* **13 (3)**: 310-311.
- Simões de Carvalho G (2003) Imunologia Aplicada em: *Biotecnologia, Fundamentos e Aplicações*, Lidel-Edições Técnicas, Lda, pp. 83-105

- Skovsted TA, Schlünssen V, Schaumburg I, Wang P, Staun-olsen P e Skov PS (2003) Only few workers exposed to wood dust are detected with specific IgE against pine Wood. *Allergy* **58**: 772-779.
- Smith P, Ong E, Knox R e Singh M (1994) Immunological relationship among group I and group V allergens from grass pollen. *Mol Immunol.* **31**: 491-8.
- Solomon WR (1986) Airborne allergens associated with small particle fractions. *Grana* **25**: 85-7.
- Solomon WR, Burge HA e Muilenberg ML (1983) Allergen carriage by atmospheric aerosol. I. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions. *J Allergy Clin Immunol* **72**: 443-7.
- Spieksma FT, Kramps JA, van der Linden AC e Nikkels BH (1990) Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction. *Clin Exp Allergy* **20**: 273-80.
- Stumvoll S, Westritschnig K, Lidholm J, Spitzauer S, Colombo P, Duro TG, Kraft D, Geraci D e Valenta R (2004) Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 111 (**5**): 974-979.
- Suphioglu C, Singh MB, Taylor P e Bellomo R (1992) Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet* **339**: 569-72.
- Susete F, Câmara IG e Pinheiro de Carvalho MÂA (2003) Palynological characterization of *Carduus squarrosus* (DC.) Lowe em: MÂA Pinheiro de Carvalho, G Costa, JJ Abreu, DM Rodrigues (eds.) Proceedings of *II Simposium Islands Ecosystems*. Abstract Book. University of Madeira, CEM, Funchal, 37-46.
- Tavares B e Todo-Bom A (2004) Pólens e Fungos em *Atlas de Imunoalergologia*, Euromédice, Edições Médicas, Lda 1-24 pp.
- Taylor PE, Flagan RC, Valenta R e Glovsky MM (2002) Release of allergens as respirable aerosols: a link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 109 (**1**): 51-56.
- Thomas WR, Smith W-A e Hales BJ (1998) Allergen-sequence diversity and T-cell recognition. *ACI News* **10**: 16-22.
- Tovey ER, Ford SA e Baldo BA (1987) Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of the resolution and detection of antigens in complex extracts. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **14**: 1-17.
- Trigo MM, Cabezudo B, Recio M e Toro FJ (1996) Annual, daily and diurnal variations of Urticaceae airborne pollen in Málaga (Spain). *International Journal of Aerobiology* **12**: 85-90.

- Valero AL, Rosell E, Amat P, Sancho J, Roig J, Piulats J e Malet A (1999) Hipersensibilidad a polen de *Platanus acerifolia*, detección de las fracciones alergénicas. *Alergol. Inmunol. Clin.* 14 (4): 220-226.
- Vega JM, Moreno I, Armentia A, Vega J, de la Fuente R e Fernández A (1999) Reacciones ocupacionales de hipersensibilidad inmediata procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*). *Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín.* 14 (1): 19-22.
- Vinckier S e Smets E (2001) The potential role of orbicules as a vector of allergens. *Allergy* 56: 1129-1136.
- Weber RW (2003) Patterns of pollen cross-allergenicity. *J Allergy Clin Immunol.* 112 (2): 229-239.
- WHO/IUS Allergen Nomenclature Subcommittee World Health Organization, Geneva, Switzerland. Allergen Nomenclature (1995). *Clin Exp Allergy* 25: 27-37.
- Wickman M, Egmar AC, Emenius G, Lindfors A, Nordvall SL e Pershagen G (1995) Epidemiology of exposure to allergens in Sweden, 2005. XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology, Madrid.
- Wissenbach M, Holm J, van Neerven RJJ e Ipsen H (1998) Grass pollen allergens: new developments. *Clin Exp All.* 28: 784-787.

ANEXOS

Extracção de proteínas

Tampão fosfato

0,1M Fosfato monosódico, 0,1M Fosfato bisódico, pH 7

Soluções para Electroforese

Tampão de Tratamento das Amostras

0,5M Tris-HCl pH 6,8	12,5% (v/v)
Glicerol	10% (v/v)
SDS 10%	20% (v/v)
2-mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de Bromofenol 0,5%	2,5% (v/v)

Tampão de Eléctrodos**Catódico** pH 8,3 (5x)

Tris	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L

Anódico pH 8,3 (5x)

Tris	15 g/L
Glicina	72 g/L

Estas soluções armazenam-se a 4°C e na altura de usar diluem-se para uma concentração 1x.

Revelação das Proteínas

Tabela A 1. Revelação das proteínas com nitrato de prata segundo Blum et al (1987).

Etapa	Solução	Tempo de reacção
<i>Fixação</i>	50% Metanol, 12% ácido acético, 0,05% formaldeído	1 Hora
<i>Lavagem</i>	50% Etanol	3x20 min
<i>Pré tratamento</i>	0,02% Tiosulfato de sódio	1 min
<i>Purificação</i>	Água destilada	3x20 s (respeitar o tempo)
<i>Impregnação</i>	0,2% Nitrato de prata, 0,075% formaldeído	20 min (no escuro)
<i>Purificação</i>	Água destilada	2x20 s (respeitar o tempo)
<i>Revelação</i>	6% Carbonato de sódio, 0,05% formaldeído e 4×10^{-4} % tiosulfato de sódio	Até 10 min
<i>Lavagem</i>	Água destilada	2x2 min
<i>Paragem da revelação</i>	50% Metanol, 12% ácido acético	10 min
<i>Fixação e armazenamento</i>	25% Etanol, 25% glicerol	20 min

Todas as etapas decorreram em leve agitação e à temperatura ambiente.

Transferência das Proteínas

Composição do Gel de Separação

Acrilamida	15 %
Bisacrilamida	0,086 %
Tris-HCl, pH 8,8	375 mM
TEMED (Merck)	0,03 %
Persulfato de amónia	0,03 %

Tampão de Transferência

Glicina	2,93 g/L
Tris	5,81 g/L
SDS	0,375 g/L
Metanol	200 ml/L

 Detecção de Alergénios

Tampão Tris Salino (TBS), 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5.

Solução de lavagem (TTBS), 0,05% (v/v) Tween-20 em TBS.

Solução de saturação, 5% leite magro em pó em TBS.

Solução de desenvolvimento da cor, 1% (v/v) reagente de coloração A, 1% (v/v) reagente de coloração B em tampão de desenvolvimento da cor.

Tampão de desenvolvimento da cor: 0,1 M Tris, pH 9,5.

Reagente de coloração A: Nitroblue tetrazolium em dimetilformamida (DMF) aquosa com cloreto de magnésio.

Reagente de coloração B: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato em DMF.

Tabela A 2. Dados dos pacientes do Laboratório Regional de Saúde Pública. d₁, *Dermatophagoides pteronyssinus*; d₂, *Dermatophagoides farinae*; e1, pêlo de gato; e2, pêlo de cão; Fx5E, teste múltiplo composto por uma mistura de alérgenos de leite, trigo, soja, amendoim, clara de ovo e bacalhau; gx1, mistura de alérgenos de gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Festuca elatior*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*; gx2, mistura de alérgenos de gramíneas: *Cynodon dactylon*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*, *Sorghum halepense*, *Paspalum motatum*; Phadiatop, teste múltiplo composto por uma mistura de alérgenos de ácaros, barata, fungos, epitélios de cão, gato e cavalo, pólenes de gramíneas, ervas daninhas e árvores.

Nº amostra	Sexo	Idade	IgE total (UI/ml)	Testes realizados		Tipo de alergia
				Positivos	Negativos	
1	M	22	11149	Phadiatop,d ₁ ,d ₂	-	Respiratória
2	M	12	940	Phadiatop,d ₁ ,d ₂	Fx5E,gx1	Respiratória
3	M	33	7481	Phadiatop	-	Respiratória
4	F	37	1013	Phadiatop,d ₁ ,d ₂	e1,e2,gx2	Respiratória
5	F	15	838	gx1,d ₁ ,d ₂	-	Respiratória
6	F	34	558	Phadiatop	Fx5E	Respiratória
7	F	3	670	Phadiatop,Fx5E	-	Alimentar/ Respiratória
8	M	-	3438	Phadiatop,Fx5E	-	Alimentar/ Respiratória
9 (controlo)	F	9	3	-	Fx5E, Phadiatop	